

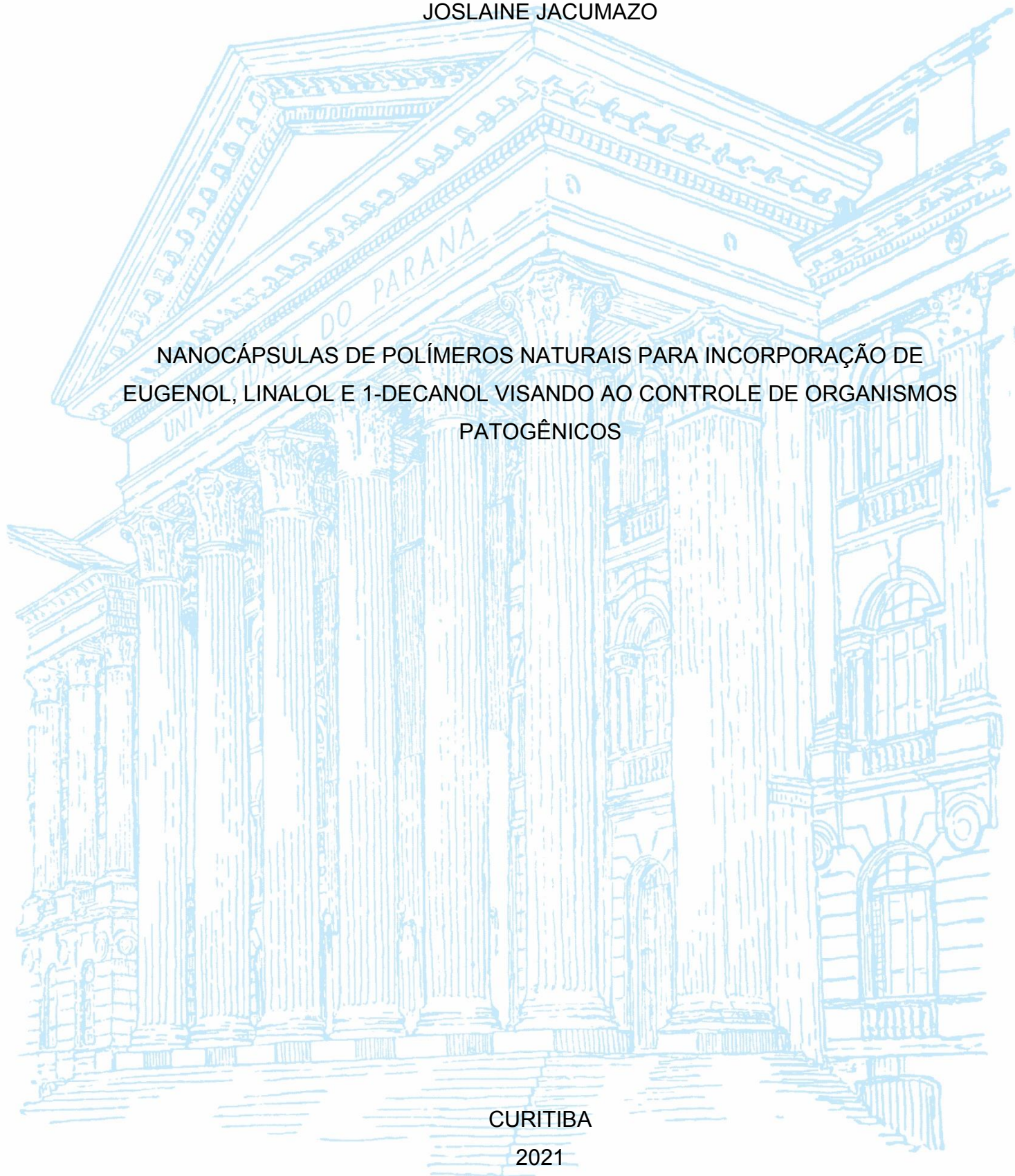
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSLAINE JACUMAZO

NANOCÁPSULAS DE POLÍMEROS NATURAIS PARA INCORPORAÇÃO DE
EUGENOL, LINALOL E 1-DECANOL VISANDO AO CONTROLE DE ORGANISMOS
PATOGÊNICOS

CURITIBA

2021



JOSLAINE JACUMAZO

NANOCÁPSULAS DE POLÍMEROS NATURAIS PARA INCORPORAÇÃO DE
EUGENOL, LINALOL E 1-DECANOL VISANDO AO CONTROLE DE ORGANISMOS
PATOGENICOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Química, Setor de Exatas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título
de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

Coorientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

J21n

Jacumazo, Joslaine

Nanocápsulas de polímeros naturais para incorporação de eugenol, linalol e 1-decanol visando ao controle de organismos patogênicos [recurso eletrônico] / Joslaine Jacumazo. – Curitiba, 2021.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

Orientador: Francisco de Assis Marques – Coorientador: Rilton Alves de Freitas

1. Nanotecnologia. 2. Cápsulas (Farmácia). 3. Biopolímeros. 4. Micro-organismos patogênicos. 5. Nanocápsulas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Freitas, Rilton Alves de. IV. Título.

CDD: 620.5

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA –
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOSLAINE JACUMAZO** intitulada **Nanocápsulas de polímeros naturais para incorporação de eugenol, linalol e 1-decanol visando ao controle de organismos patogênicos**, sob orientação do Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS MARQUES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2021.

FRANCISCO DE ASSIS MARQUES
Presidente da Banca Examinadora

MARIA APARECIDA FERREIRA CÉSAR-OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

ODINEI HESS GONÇALVES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, esposo, irmão, toda minha família e
a todos que acreditaram no meu potencial e me
ajudaram a concretizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido com a contribuição de pessoas maravilhosas que surgiram ao longo dessa caminhada, as quais sou imensamente grata pelas contribuições na construção do meu conhecimento e da minha carreira como cientista. Por isso, dedico esse espaço para agradecer:

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques pela maravilhosa orientação, por ser paciente comigo, pelos conselhos, pela amizade e por todas às discussões científicas. Te agradeço imensamente pela oportunidade e pela convivência, embora não diária, mas que me proporcionou um enorme crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Rilton Alves de Freitas pela magnífica coorientação, por toda ajuda, incentivo, conselhos e paciência, por ser um dos melhores pesquisadores e professores que eu admiro desde 2015 quando fiz sua disciplina como aluna externa. Muito obrigada por abrir as portas do laboratório e pela maravilhosa convivência durante todo esse período.

Ao corpo docente do PPGQ da UFPR e aos professores responsáveis pelas várias disciplinas que cursei e que compartilharam seus conhecimentos para minha formação.

Aos professores do Departamento de Química e do Setor de Educação da UFPR. Em paralelo ao doutorado cursei Química Licenciatura e que se tornou uma experiência incrível. Em especial agradeço às professoras Dra. Camila S. da Silva, Dra. Soeli T. Pereira, Dra. Cristina Teixeira e ao professor Dr. Everton Bedin, pelas discussões, explicações e por mostrarem uma visão tão linda e especial da importância da educação e da responsabilidade em ser professor.

Aos membros da banca de qualificação, professora Dra. Maria A. F. César-Oliveira, professora Dra. Ana L. L. Lordello e professora Dra. Maria Alice Witt pela leitura crítica do documento e valiosas sugestões.

Aos membros da banca de defesa, professora Dra. Maria A. F. César-Oliveira, professora Dra. Beatriz H. L. N. S. Maia e professora Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes e ao professor Dr. Odinei Hess Gonçalves, pelo aceite e disponibilidade em avaliar esse trabalho.

Aos amigos do Laboratório BioPol e do LECOSIN por toda ajuda, discussões científicas e convivência amigável. Aqui destaco meu agradecimento especial à Meira,

Fran, Gabi e Nayana por toda ajuda nos experimentos, não importando se era sábado, domingo, natal ou ano novo, agradeço de coração.

Às minhas queridas amigas-irmãs Gabi, Bianca, Fer, Lilian e Fran por todos os momentos maravilhosos e especiais que passamos juntas, por todos os “bolos de Sto. Antônio”, “potes da felicidade” e “sonhos de frutas vermelhas” que compartilhamos nos momentos alegres e em alguns momentos não tão alegres, obrigada por existirem em minha vida.

Aos amigos do DQ e do PPGQ, os quais surgiram em disciplinas, pelos corredores ou mesmo no simples empréstimo de reagentes ou água purificada.

À Dra. Tatiane Brugnari e professora Dra. Giselle Maria Maciel do Departamento de Química e Biologia da UTFPR pelas análises microbiológicas. Em especial a Tatiane, por toda atenção e discussões científicas.

À professora Dra. Louise Larissa May De Mio do Departamento de Agronomia da UFPR, por disponibilizar seu laboratório para os testes com as nectarinas, além disso, pelas valiosas discussões sobre os resultados.

Ao professor Dr. Maurício Ursi Ventura do Departamento de Agronomia da UEL pela disponibilidade em realizar os testes de repelência à mosca branca.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, em especial ao Dr. Deonir Agustini pelas análises de MEV.

Ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR pelas análises de RMN de ^1H .

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo do Departamento de Farmácia da UFPR pelo uso do equipamento de infravermelho.

Ao Angelo R. dos S. Oliveira do Departamento de Química da UFPR pelas análises termogravimétricas.

Ao Dr. Rodolfo Debone Piazza do Departamento de Química da UNESP, por ter realizado análises termogravimétricas e pela amizade que se iniciou durante seu período de pós-doutorado no BioPol.

À Dra. Mariana M. de Carvalho pela ajuda em experimentos, interpretação de dados e na escrita de artigos.

Ao Dr. Thiago Alexandre Silva do Departamento de Eng. Química da UFPR pelas análises de GPC e pelas conversas sempre muito produtivas.

À coordenação do PPGQ, em especial aos secretários Marcelino e Fernanda.

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química pela estrutura.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao pessoal do álcool gel, por todos os momentos tão alegres e de aprendizado que passamos juntos, mesmo em um momento tão difícil de pandemia. Em especial a Priscila Lagner, uma pessoa incrível que se tornou uma grande amiga, agradeço ainda pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus amigos de longe que nunca deixaram de estar presentes, especialmente ao Sandro, Aline e Lucieli.

Aos meus pais, Florindo e Bernadete, por todo apoio emocional, psicológico e financeiro, pelas orações, pelo amor, amizade, torcida, por tudo que abriram mão para que eu e meu irmão pudéssemos estudar. De origem tão humilde e sempre acreditando que a educação seria a melhor escolha. Muito obrigada por tudo. Agradeço também ao meu irmão, Ronaldo, pela parceria e incentivo de sempre.

À minha vovózinha Alzira, um exemplo de pessoa há 82 anos, sempre com palavras tão doces e otimistas. Agradeço por suas orações, por seu amor e por sempre falar a frase “É a vida!”.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas, que sempre torceram e me incentivaram.

À minha Mel, por todo carinho, alegria e amor que foram essenciais ao longo dessa jornada. Por ser minha companheira e fiscal durante a escrita da tese.

E claro, ao meu querido esposo Israel, pelo incentivo, carinho, atenção, paciência, amizade, cuidado, por todos os conselhos e pelo amor incondicional.

"Aqueles que contemplam a beleza da terra, encontram reservas de força que irão perdurar enquanto a vida durar. Há algo infinitamente curativo nos refrões repetidos da natureza: a garantia de que o amanhecer vem depois da noite e a primavera depois do inverno."
(Rachel Carson)

"Nós chegamos tão longe porque somos as criaturas mais inteligentes que já existiram. Mas, para seguir em frente, precisamos mais do que inteligência: precisamos de sabedoria."
(David Attenborough em "*A Life on Our Planet*" 2020).

RESUMO

A produção de alimentos desempenha um papel essencial no crescimento e desenvolvimento da economia de qualquer país. A agricultura é praticada desde os tempos antigos e, desde então, vários recursos foram adotados para melhorar o rendimento da produção e o controle de pragas e doenças agrícolas. O surgimento de diversos fitopatógenos abriram caminhos para a introdução de um número elevado de pesticidas, incluindo fungicidas, herbicidas, repelentes e inseticidas. Entretanto, esses pesticidas podem causar danos severos ao ecossistema devido à sua alta persistência no local em que são aplicados. Nas últimas décadas emergiram alternativas a esses produtos químicos tóxicos. Dentro dessas estratégias estão os óleos essenciais. Os óleos essenciais são uma mistura complexa de substâncias naturais extraídas de plantas, que tem como um dos papéis fundamentais a proteção dessas plantas. Essas substâncias, isoladas ou mesmo a mistura, são conhecidas por suas excelentes atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, terapêutica e repelente. No entanto, existem alguns fatores limitantes para a sua aplicabilidade, entre eles a volatilidade, oxidação, odor e baixa solubilidade em água. Para superar essas limitações podem ser adotadas estratégias de encapsulação dessas substâncias em escala nanométrica. Além de proporcionar uma proteção, a nanoencapsulação aumenta a biodisponibilidade dos ativos e a interação, devido à maior área superficial, com o sítio alvo, entre outros. Nesta direção, no presente trabalho foram desenvolvidas metodologias baseadas na encapsulação de compostos majoritários dos óleos essenciais: cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*, L. - eugenol) e coentro (*Coriandrum sativum* L. - linalol e 1-decanol). O linalol e o 1-decanol, foram previamente identificados como constituintes majoritários das sementes e das folhas do coentro, respectivamente. As nanocápsulas foram obtidas utilizando os métodos de autoassociação *Layer-by-Layer* e deposição interfacial e a partir de biopolímeros como a quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Foram desenvolvidas sete formulações e a liberação *in vitro* dos compostos a partir das nanocápsulas, em geral, se mostrou rápida nos tempos iniciais seguida por uma liberação mais gradual. Ao contrário do linalol e 1-decanol, o eugenol apresentou melhor percentual de atividade antioxidante pelos métodos de captura de radicais livres (DPPH[•] e ABTS^{•+}). Quando encapsulado, esse percentual foi observado em menor intensidade, possivelmente devido à proteção que os biopolímeros exercem sobre o composto retardando sua liberação para o meio. Em geral, os três compostos, eugenol, linalol e 1-decanol quando encapsulados, apresentaram maior efeito inibitório sobre o crescimento de micro-organismos patogênicos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Gliocladium* sp, *Trichoderma* sp, *Monilinia fructicola*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) do que quando os compostos livres. Além disso, as nanocápsulas na ausência dos compostos também exerceram uma boa atividade antimicrobiana. Contra os insetos (*Bemisia tabaci*), as nanocápsulas contendo linalol e 1-decanol exerceram atividade repelente, entretanto, as formulações necessitam ser aprimoradas. Em linhas gerais, este trabalho pode abrir novos caminhos para o encapsulamento de compostos naturais que apresentam potencial no controle de pragas e doenças em alimentos, aumentando a vida útil desses produtos e ampliando a segurança alimentar, tornando-se, consequentemente, uma metodologia viável frente a agentes químicos tóxicos.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanocápsulas. Biopolímeros. Compostos naturais. Organismos patogênicos.

ABSTRACT

Food production plays an essential role in the growth and development of any country's economy. Agriculture has been practiced since ancient times, and since then, various resources have been adopted to improve production yields and control agricultural pests and diseases. The emergence of several phytopathogens opened the way for the introduction of many pesticides, including fungicides, herbicides, repellents, and insecticides. However, these pesticides can cause severe damage to the ecosystem due to their high persistence in the place where they are applied. In the last decades, biological strategies have emerged as an alternative to these toxic chemicals. Within these strategies are essential oils. Essential oils are a complex mixture of natural substances extracted from plants, which have as one of the fundamental roles the protection of these plants. These substances, isolated or even the mixture, are known for their excellent biological activities, such as antimicrobial, antioxidant, therapeutic and repellent activities. However, there are some limiting factors for its applicability, including volatility, oxidation, aromatic odor, and low solubility. To overcome these limitations, encapsulation strategies for these substances on a nanometer scale can be adopted. In addition to providing protection, nanoencapsulation increases the bioavailability of actives and the interaction, due to the greater surface area, with the target site, among others. In this direction, the present work developed methodologies based on the encapsulation of major compounds of essential oils: *Syzygium aromaticum*, L. (eugenol) and *Coriandrum sativum*, L. (linalool and 1-decanol). Linalool and 1-decanol were previously identified as major constituents of coriander seeds and leaves, respectively. The nanocapsules were obtained using the Layer-by-Layer self-assembly and interfacial deposition methods and from biopolymers such as chitosan, carboxymethylcellulose and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Seven formulations were developed and the in vitro release of compounds from nanocapsules, in general, was fast in the initial times, followed by a more gradual release. Unlike to linalool and 1-decanol, eugenol showed a better percentage of antioxidant activity by free radical scavenging methods (DPPH[•] and ABTS^{•+}). When encapsulated, this percentage was observed in lower intensity, possibly due to the protection that biopolymers exert on the compound, delaying its release to the environment. In general, the three compounds, eugenol, linalool and 1-decanol, when encapsulated, had a greater inhibitory effect on the growth of pathogenic microorganisms (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Glucocladium* sp, *Trichoderma* sp, *Monilinia fructicola*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) than when free compounds. Furthermore, nanocapsules in the absence of the compounds also exerted a good antimicrobial activity. Against insects (*Bemisia tabaci*), the nanocapsules containing linalool and 1-decanol exerted a certain repellent activity, but the formulations need to be improved. The nanocapsules containing linalool and 1-decanol exerted repellent activity, however, the formulations need to be improved. In general terms, this work can open new paths for the encapsulation of natural compounds that have potential to control pests and diseases in food, increasing the shelf life of these products and increasing food safety, thus becoming a viable methodology to toxic chemical agents.

Keywords: Nanotechnology. Nanocapsules. Biopolymers. Natural compounds. Pathogenic organisms.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DICLORO-DIFENIL-TRICLOROETANO (DDT).....	31
FIGURA 2 - TOTAL DE AGROTÓXICOS E PRODUTOS DE BAIXO RISCO REGISTRADOS E APROVADOS POR ANO NO BRASIL NO PERÍODO DE 2000 A 2020	32
FIGURA 3 - IMAGEM DE UM GRUPO DE INSETOS ADULTOS DA <i>Bemisia tabaci</i> EM FOLHAS DE <i>Physalis peruviana</i>	37
FIGURA 4 - IMAGEM DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA <i>Coriandrum sativum</i> L., FOLHAS E SEMENTES. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO (A) 1-DECANOL E (B) LINALOL	42
FIGURA 5 - IMAGEM DO BOTÃO DE FLOR SECO DO CRAVO <i>Syzygium aromaticum</i> E ESTRUTURA QUÍMICA DO EUGENOL	44
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS)	47
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE INSTABILIDADE MAIS COMUNS QUE OCORREM EM EMULSÕES DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA: INVERSÃO DE FASE, CREMEÇÃO, SEDIMENTAÇÃO, FLOCULAÇÃO, COALESCÊNCIA E AMADURECIMENTO DE OSTWALD	48
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO QUITOSANA NA SUA FORMA NEUTRA E PROTONADA. n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA UNIDADE DE B-N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA E B-D-GLUCOSAMINA, REPECTIVAMENTE	50
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO CARBOXIMETILCELULOSE NA SUA FORMA NEUTRA E DESPROTONADA. n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE B-D-GLUCOPIRANOSE CARBOXIMETILADAS E B-D-GLUCOPIRANOSE, RESPECTIVAMENTE.....	51
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO). n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DO HIDROXIBURIRATO E HIDROXIVALERATO, RESPECTIVAMENTE	51
FIGURA 11 - ESQUEMA DO PREPARO DAS AMOSTRAS DAS FOLHAS DE COENTRO PARA A SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	55
FIGURA 12 - IMAGEM DO ASPECTO MACROSCÓPICO DA QUITOSANA APÓS O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO E SECAGEM	57
FIGURA 13 - IMAGEM DO ASPECTO MACROSCÓPICO DO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO) APÓS O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO E SECAGEM	58
FIGURA 14 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE PELO MÉTODO LbL	63
FIGURA 15 - ESQUEMA DA FORMULAÇÃO 2 DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE PELO MÉTODO LbL	64
FIGURA 16 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE PHBV PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL.....	66
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA REFERENTE AOS ENSAIOS QUE CADA FORMULÇÃO FOI SUBMETIDA	76
FIGURA 18 - (A) FRUTOS NECTARINA SANITIZADOS, (B) LOCAL DO EXPERIMENTO COM OS FRUTOS NECTARINAS EM CÂMARA ÚMIDA.....	79

FIGURA 19 - TOMATEIROS CONTENDO OS TRATAMENTOS PARA A REPELÊNCIA DA MOSCA BRANCA	82
FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ENANTIÔMEROS 3 <i>R</i> -(-)-LINALOL E 3 <i>S</i> -(+)-LINALOL	84
FIGURA 21 – ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS (A) VARIÂNCIA DOS DADOS, (B) SCORES DA PCA (PC1 VS PC2), (C) <i>LOADINGS</i> DA PC1, (D) <i>LOADINGS</i> DA PC2	91
FIGURA 21 – ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS (E) SCORES DA PCA (PC1 VS PC3), (F) SCORES DA PCA (PC2 VS PC3), (G) <i>LOADINGS</i> DA PC3	92
FIGURA 22 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO (-) LINALOL, (-) 1-DECANOL E (-) EUGENOL.....	94
FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H PARA: (A) PHBV NÃO PURIFICADO E (B) PHBV PURIFICADO (CDCL ₃ A 25 °C, 400 MHZ)	99
FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H PARA: (A) QUITOSANA NÃO PURIFICADA, (B) QUITOSANA PURIFICADA (D ₂ O/CD ₃ COOD A 70 °C, 400 MHZ) E (C) CARBOXIMETILCELULOSE (D ₂ O A 70 °C, 400 MHZ)	101
FIGURA 25 - CURVA DE TITULAÇÃO POTENCIMÉTRICA E PRIMEIRA DERIVADA DA: (A) QUITOSANA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE HCL (0,1 mol L ⁻¹) PH VERSUS VOLUME DA SOLUÇÃO AQUOSA DE NAOH (0,1 mol L ⁻¹), (B) CARBOXIMETILCELULOSE EM SOLUÇÃO AQUOSA DE NAOH (0,1 mol L ⁻¹) PH VERSUS VOLUME DA SOLUÇÃO AQUOSA DE HCL (0,1 mol L ⁻¹)	104
FIGURA 26 - (A) ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO (D ₂ O/CD ₃ COOD A 20 °C, 400 MHZ), (B) CURVAS DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO EM ÁGUA (PRETO) E EM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,01 mol L ⁻¹ (VERDE)	105
FIGURA 27 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS GOTÍCULAS DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO CONTENDO EUGENOL.....	107
FIGURA 28 - POTENCIAL Z DURANTE A FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS COM DISPERSÕES DE QUITOSANA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, 2 mg mL ⁻¹ , 6 mg mL ⁻¹ E 10 mg mL ⁻¹	107
FIGURA 29 - (A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUITOSANA CATIÔNICA, (B) VALORES DE POTENCIAL Z EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CAMADAS DE POLÍMERO DEPOSITADAS NO DECORRER DO PROCESSO DE AUTOASSOCIAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS, (B) DIREITA: IMAGENS MACROSCÓPICAS DA FORMAÇÃO DAS CÁPSULAS NOS TEMPOS DE 0 h E 1 h	109
FIGURA 30 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A QUITOSANA, LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS), EUGENOL, NANOCÁPSULAS LSS-LbL ₁ E NANOCÁPSULAS EUGENOL-LbL ₁	111
FIGURA 31 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CARBOXIMETILCELULOSE; NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₁ E Eugenol-LbL ₂	112
FIGURA 32 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA: (A) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₃ , (B) MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL ₄ , E (C) MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL ₅	114
FIGURA 33 - (A) EFEITO DOS DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (30-600 s) SOBRE (-■-) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D _{HAPP}) MÉDIO E (-●-) ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IP _d) DA NANOEMULSÃO DE EUGENOL E (B) ENERGIA APLICADA EM RELAÇÃO AO IP _d (-▼-) DA NANOEMULSÃO DE EUGENOL DETERMINADA POR DLS	115
FIGURA 34 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D _{HAPP}) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS COM DIFERENTES NÚMERO DE CAMADA POLIMÉRICA PARA (A) CONDIÇÃO 1: DISPERSÃO	

POLIMÉRICA SOBRE NANOEMULSÃO (-■-) E CONDIÇÃO 2: NANOEMULSÃO SOBRE A DISPERSÃO POLIMÉRICA (-●-), (B) VARIAÇÃO DO POTENCIAL Z EM RELAÇÃO À ORDEM DE ADIÇÃO DOS PRECURSORES PARA A CONDIÇÃO 1 (■) E CONDIÇÃO 2 (■)..... 116

FIGURA 35 - TERMOGRAMAS DO EUGENOL, MISTURA DE QUITOSANA-CARBOXIMETILCELULOSE E NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁₋₂ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO 119

FIGURA 36 - VARIAÇÃO DO POTENCIAL Z EM RELAÇÃO ÀS DISPERSÕES DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, 0,5; 1,0 E 2,0 mg mL⁻¹ 120

FIGURA 37 – MODELO DE CONFORMAÇÃO QUE OS POLIELETRÓLITOS PODEM ASSUMIR EM ALTAS OU BAIXAS CONCENTRAÇÕES EM RELAÇÃO A UM SUBSTRATO 121

FIGURA 38 - VARIAÇÃO NOS VALORES DE (A) FREQUÊNCIA, (B) MASSA, (C) DISSIPAÇÃO DURANTE A DEPOSIÇÃO DE CAMADAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE (ν : 3) .. 123

FIGURA 39 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA O CRISTAL DE QUARTZO, DISPERSÃO DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg mL⁻¹. ÁREA DE VARREDURA DE 2 X 2 μ M 125

FIGURA 40 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA PARA O (A) LINALOL, NANOCÁPSULAS LbL₁₋₂ VAZIAS E NANOCÁPSULAS LIN-LbL₁₋₂, (B) 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS LbL₁₋₂ VAZIAS E NANOCÁPSULAS 1DEC-LbL₁₋₂ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO..... 127

FIGURA 41 - (A) DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS E (B) EFEITOS PRINCIPAIS PARA A EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%) DO EUGENOL NAS NANOCÁPSULAS..... 131

FIGURA 42 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO PARA A VARIAÇÃO DA HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL⁻¹) (A) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL⁻¹) (B) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) (C) EM RELAÇÃO A EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%)..... 132

FIGURA 43 - (A) DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS E (B) EFEITOS PRINCIPAIS PARA O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{HAPP} / NM) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL 134

FIGURA 44 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTORNO PARA A VARIAÇÃO DA HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL⁻¹) (A) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL⁻¹) (B) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) (C) EM RELAÇÃO AO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{HAPP})..... 135

FIGURA 45 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA PARA O EUGENOL, PHBV E NANOCÁPSULAS Eug-PHBV SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO 136

FIGURA 46 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA O (A) LINALOL, PHBV E NANOCÁPSULAS LIN-PHBV, (B) 1-DECANOL, PHBV E NANOCÁPSULAS 1DEC-PHBV SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO..... 139

FIGURA 47 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO 140

FIGURA 48 - EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO APÓS A DEPOSIÇÃO DE CADA CAMADA DE POLÍMERO..... 142

FIGURA 49 - PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DO EUGENOL: NANOEMULSÃO EUGENOL-LSS (-■-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₁ (-●-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₂ (-▲-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₃ (-◆-), MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL ₄ (-▼-) E MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL ₅ (-►-)	145
FIGURA 50 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EUGENOL EM (A) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₁ EM MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH A 25 °C: (-▲- pH 3,8), (-●- pH 6,8) E (-▼- pH 8,8); (B) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₂ EM MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH A 25 °C: (-◆- pH 3,8), (-▲- pH 6,8) E (-►- pH 8,8)	148
FIGURA 51 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EUGENOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (-■-) EUGENOL LIVRE (-●-) NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₁ , (-▲-) NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₂	150
FIGURA 52 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO LINALOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (-■-) NANOEMULSÃO DE LINALOL (-●-) NANOCÁPSULAS LIN-LbL ₁ , (-▲-) NANOCÁPSULAS LIN-LbL ₂	151
FIGURA 53 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO 1-DECANOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (-■-) NANOEMULSÃO DE 1-DECANOL (-●-) NANOCÁPSULAS 1DEC-LbL ₁ , (-▲-) NANOCÁPSULAS 1DEC-LbL ₂	152
FIGURA 54 - PERFIL DE LIBERAÇÃO PARA (-■-) EUGENOL (-●-) LINALOL E (-▲-) 1-DECANOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS DE PHBV	153
FIGURA 55 - REAÇÕES QUE PODEM OCORRER ENTRE O RADICAL DPPH• E O COMPOSTO EUGENOL	155
FIGURA 56 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH• EM DIFERENTES TEMPOS PARA (A) NANOEMULSÃO (B) NANOCÁPSULAS COM UMA CAMADA POLIMÉRICA (Eug-LbL ₁) E (C) NANOCAPSULAS COM DUAS CAMADAS POLIMÉRICA (Eug-LbL ₂) EM RELAÇÃO AO EUGENOL LIVRE	156
FIGURA 57 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH• EM DIFERENTES TEMPOS PARA AS NANOCÁPSULAS DE PHBV CONTENDO O EUGENOL EM RELAÇÃO AO ATIVO LIVRE	158
FIGURA 58 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH EM DIFERENTES TEMPOS PARA A (A) NANOEMULSÃO (B) NANOCÁPSULAS COM UMA CAMADA POLIMÉRICA (LIN-LbL ₁) E (C) NANOCAPSULAS COM DUAS CAMADAS POLIMÉRICA (LIN-LbL ₂) EM RELAÇÃO AO LINALOL	159
FIGURA 59 - ASPECTOS VISUAIS DOS TRATAMENTOS REALIZADOS SOBRE A NECTARINA COM: CONTROLE (ÁGUA), NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₁ E NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₂	161
FIGURA 60 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (n = 6) DOS ÂNGULOS DE CONTATO (θ) DOS LÍQUIDOS ÁGUA, FORMAMIDA E DIODOMETANO PARA NECTARINAS NÃO TRATADAS (CONTROLE) E TRATADAS COM NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DE EUGENOL (Eug-LbL ₁₋₂) E NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (LbL ₁₋₂ VAZIAS)	162
FIGURA 61 - (A) ENERGIA LIVRE DE SUPERFÍCIE (γ^{TOTAL}), COMPONENTES DE LIFSHITZ-VAN DER WAALS (γ^{LW}) E ÁCIDA (γ^{+}) E BÁSICA (γ^{-}) OBTIDAS PELO MODELO LWAB PARA AS AMOSTRAS CONTROLE E NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE EUGENOL	164
FIGURA 62 - TRABALHO DE ADESÃO (W_a) DAS NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EUGENOL SOBRE AS NECTARINAS	165
FIGURA 63 - TESTE DE INIBIÇÃO DO PATOGÊNO <i>Monilinia fructicola</i> EM NECTARINAS POR PERÍODO DE 7 DIAS UTILIZANDO (-■-) SOLUÇÃO AQUOSA DE EUGENOL, (-◆-) IPRODIONA, (-●-) CONTROLE, (-▼-) NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (LbL ₁ VAZIAS), (-►-) NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DE EUGENOL Eug-LbL ₁ E (-▲-) Eug-LbL ₂	169

FIGURA 64 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS MICRO-ORGANISMOS (A) <i>Aspergillus niger</i> , (B) <i>Candida albicans</i> , (C) <i>Escherichia coli</i> E (D) <i>Staphylococcus aureus</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM NANOEMULSÃO CONTENDO LINALOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA PRESENÇA DE LINALOL (LIN-LbL ₁ E LIN-LbL ₂) E NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE LINALOL (LbL ₁ E LbL ₂ VAZIAS)	172
FIGURA 65 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS MICRO-ORGANISMOS (A) <i>Aspergillus niger</i> , (B) <i>Candida albicans</i> , (C) <i>Escherichia coli</i> , (D) <i>Staphylococcus aureus</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM 1-DECANOL, NANOEMULSÃO CONTENDO 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA PRESENÇA DE 1-DECANOL (1DEC-LbL ₁ E 1DEC-LbL ₂)	173
FIGURA 66 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) PARA (A) <i>Aspergillus niger</i> , (B) <i>Candida albicans</i> , (C) <i>Escherichia coli</i> , (D) <i>Staphylococcus aureus</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV LIN-PHBV OU 1DEC-PHBV, NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCS PHBV VAZIAS)	176
FIGURA 67 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) PARA (A) <i>Aspergillus niger</i> , (B) <i>Candida albicans</i> , (C) <i>Escherichia coli</i> , (D) <i>Staphylococcus aureus</i> EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM EUGENOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV EUG-PHBV E NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (NCS PHBV VAZIAS).....	178
FIGURA 68 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS FUNGOS (A) <i>Aspergillus niger</i> (B) <i>Candida albicans</i> E DAS BACTÉRIAS (C) <i>Escherichia coli</i> (D) <i>Staphylococcus aureus</i> UTILIZANDO AS NANOCÁPSULAS VAZIAS DE QUITOSANA, MICRO E NANOCÁPSULAS VAZIAS DE PHBV	181
FIGURA 69 – VALORES DE POTENCIAL ZETA PARA A MISTURA DAS FORMULAÇÕES DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE COM OS MICRO-ORGANISMOS.....	183
FIGURA 70 - VALORES DE POTENCIAL ZETA PARA A MISTURA DAS FORMULAÇÕES DE PHBV COM OS MICRO-ORGANISMOS	184
FIGURA 71 - ENSAIOS DE REPELÊNCIA DA <i>Bemisia tabaci</i> EM RELAÇÃO ÀS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA, CARBOXIMETILCELULOSE E PHBV CONTENDO LINALOL OU 1-DECANOL	185

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÍVEIS E VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL	66
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS SEMENTES DE <i>C. sativum</i> ATRAVÉS DE CG-EM.....	84
TABELA 3 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO <i>C. sativum</i> UTILIZANDO A CONDIÇÃO A (CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO) ATRAVÉS DE CG-EM	86
TABELA 4 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO <i>C. sativum</i> UTILIZANDO A CONDIÇÃO B (MACERAMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE) ATRAVÉS DE CG-EM	88
TABELA 5 - BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO OBSERVADAS NOS ESPECTROS DOS COMPOSTOS LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL	95
TABELA 6 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL	96
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLÍMEROS QUITOSANA NÃO PURIFICADA, PURIFICADA E CARBOXIMETILCELULOSE	97
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO POLÍMERO PHBV NÃO PURIFICADO E PURIFICADO	98
TABELA 9 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE ^1H PARA O HIDROXIBUTIRATO (HB) E HIDROXIVALERATO (HV) FORMADORES DO PHBV.....	99
TABELA 10 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE ^1H PARA A QUITOSANA E PARA A CARBOXIMETILCELULOSE	102
TABELA 11 - ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA QUITOSANA, NANOEMULSÃO Eugenol-LSS, NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EUGENOL.....	110
TABELA 12 - VALORES DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_h) E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPd) OBTIDOS POR DLS E DIÂMETROS MÉDIOS OBTIDOS POR MEV PARA A NANOEMULSÃO, NANO E MICROCÁPSULAS CONTENDO O EUGENOL	113
TABELA 13 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS DO EUGENOL, MISTURA QUITOSANA+CARBOXIMETILCELULOSE E NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL (Eug-LbL ₁₋₂) A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO	118
TABELA 14 - ÂNGULO DE CONTATO DOS CISTAS DE QUARTZO MODIFICADOS	124
TABELA 15 - VALORES DE POTENCIAL ζ E D_h PARA AS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE LINALOL E 1-DECANOL.....	126
TABELA 16 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS DO LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO LINALOL OU 1-DECANOL E NANOCÁPSULAS QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO.....	128
TABELA 17 - RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%), DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_h / nm) MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPd) PARA OS FATORES X1, X2 E X3	130
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%) DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL	130

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (Dh nm) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL	133
TABELA 20 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O EUGENOL, PHBV, NANOCÁPSULAS Eug-PHBV A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO	137
TABELA 21 - VALORES DE POTENCIAL ζ E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (Dh) PARA AS NANOCÁPSULAS DE LINALOL E 1-DECANOL	138
TABELA 22 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DOS ATIVOS A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO	138
TABELA 23 - EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%) DO LINALOL E 1-DECANOL EM NANOCÁPSULAS COM QUITOSNA (LbL ₁) E COM CARBOXIMETILCELULOSE (LbL ₂).....	143
TABELA 24 - VALORES DOS PARÂMETROS OBTIDOS APÓS A APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO DE PRIMEIRA ORDEM PARA A NANOEMULSÃO DE Eugenol, NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₁ , NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₂ , NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL ₃ , MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL ₄ E MICROCÁPSULAS Eugenol-LSS-LbL ₅	146
TABELA 25 - EFEITO DO pH DO MEIO NA LIBERAÇÃO DO EUGENOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA (Eugenol-LbL ₁) E CARBOXIMETILCELULOSE (Eugenol-LbL ₂)	149
TABELA 26 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EUGENOL, NANOEMULSÃO DE EUGENOL, NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₁ , NANOCÁPSULAS Eug-LbL ₂ , NANOCÁPSULAS Eug-PHBV VIA ENSAIOS ANTIOXIDANTES ABTS*+	159
TABELA 27- VALORES DE TENSÃO SUPERFICIAL TOTAL (γ^{total}) E DAS COMPONENTES DISPERSIVAS (γ^{LW}), POLAR (γ^{AB}), ÁCIDA (γ^+) E BÁSICA (γ^-) DO MODELO LWAB PARA OS LÍQUIDOS ÁGUA, FORMAMIDA E DIODOMETANO.	163
TABELA 29 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI ₅₀) PARA AS AMOSTRAS LINALOL, 1-DECANOL, NANOEMULSÃO (Ne) DE LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCs LbL ₁ E LbL ₂) E NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS (NCs LbL ₁ E LbL ₂ vazias) FRENTE AOS FUNGOS <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , E BACTÉRIAS <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	175
TABELA 30 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (CI ₅₀) PARA AS AMOSTRAS LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCs Lin-PHBV E 1Dec-PHBV) E NANOCÁPSULAS PHBV NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS (NCs PHBV vazias) FRENTE AOS FUNGOS <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> E BACTÉRIAS <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	179

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS E SÍMBOLOS

AAO	Atividade antioxidante
ABTS	Ácido (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))
a.C	Antes de Cristo
AFM	Microscopia de força atômica (em inglês <i>Atomic force microscopy</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR%	Áreas relativas em porcentagem
BDA	Batata dextrose ágar
CA	Condição A
CB	Condição B
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CD ₃ COOD	Ácido acético deuterado
CEASA	Central de abastecimento
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cmc	Concentração micelar crítica
C1	Condição 1
C2	Condição 2
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (em inglês <i>Dynamic light scattering</i>)
D _{happ}	Diâmetro hidrodinâmico aparente
dn/dc	Incremento do índice de refração em função da concentração
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
D ₂ O	Água deuterada
EGF	Fator de crescimento epidérmico (em inglês <i>Epidermal growth factor</i>)
ee	Excesso enantiomérico
EHL	Equilíbrio hidrofílico / lipofílico
EI	Eficiência de incorporação
Eug	Eugenol
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (em inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>)
GD	Grau de desacetilação
GPC/SEC	Cromatografia de permeação em gel ou cromatografia de exclusão por tamanho (em inglês <i>Gel permeation chromatography/size-exclusion chromatography</i>)
GS	Grau de substituição
HB	Hidroxibutirato
HS-SPME	<i>Headspace - Solid Phase Microextraction</i>
HV	Hidroxivalerato
IBAMA	Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis do Meio Ambiente
IPd	Índice de polidispersão
IR	Índice de refração
IRet	Índice de retenção
LALLS	Espalhamento de luz laser de baixo ângulo (em inglês <i>Low angle laser light scattering</i>)
LbL	Camada por camada (em inglês <i>Layer-by-Layer</i>)
LD	Limite de detecção

Lin	Linalol
LQ	Limite de quantificação
LSS	Lauril sulfato de sódio
LWAB	Lifshitz-van der Waals/Lewis ácido-base
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCs	Microcápsulas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M _n	Massa molecular média numérica
M _v	Massa molar média viscosimétrica
M _w	Massa molar média ponderal
N _a	Número de Avogadro
NCs	Nanocápsulas
NCs LbL ₁	Nanocápsulas de quitosana
NCs LbL ₂	Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose
PCA	Análise das componentes principais (em inglês <i>Principal Component Analysis</i>)
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PC1	Primeira componente principal
PC2	Segunda componente principal
PC3	Terceira componente principal
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano / divinilbenzeno
pH	Potencial hidrogeniônico
PHAs	Poli(hidroxialcanoatos)
PHB	Poli(hidroxibutirato)
PHBV	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PLGA	Poli(D, L-lactídeo-co-glicolídeo)
PLLA	Poli(ácido L-láctico)
PTFE	Politetrafluoretileno
QCM-D	Micro-balança de cristal de quartzo com dissipação (em inglês <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation</i>)
RALLS	Espalhamento de luz laser em ângulo reto (em inglês <i>Right angle laser light scattering</i>)
R _g	Raio de giro
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TROLOX	Ácido-6-hidróxi-2,6,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta visível
W _a	Trabalho de adesão
1Dec	1-Decanol
“a”	- Coeficiente Mark-Houwink-Sakurada
(α)	- Grau de ionização
[α]	- Rotação específica
c*	- Concentração crítica
Đ	- Dispersão
δ	- Deslocamento químico
K	- Constante do polímero
k	- Constante de liberação
[η]	- Viscosidade intrínseca
®	- Marca registrada
ζ	- Zeta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
1.2.	OBJETIVOS	29
1.2.1.	Objetivo geral	29
1.2.2.	Objetivos específicos.....	29
2.	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1.	A AGRICULTURA E OS AGROTÓXICOS	30
2.2.	ORGANISMOS PATOGÊNICOS.....	33
2.2.1.	Fungos causadores de doenças em alimentos e humanos	33
2.2.2.	Bactérias causadoras de doenças em humanos	36
2.2.3.	Insetos nocivos causadores de danos às plantações.....	37
2.3.	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	39
2.3.1.	Óleo essencial do <i>Coriandrum sativum</i>	41
2.3.2.	Óleo essencial do <i>Syzygium aromaticum</i>	43
2.4.	NANOENCAPSULAÇÃO	44
2.4.1.	Polímeros com potencial de aplicação em nanocápsulas	49
3.	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1.	MATERIAL.....	53
3.2.	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO COENTRO	54
3.2.1.	Hidrodestilação das sementes do <i>Coriandrum sativum</i>	54
3.2.2.	Microextração em fase sólida dos voláteis das folhas do <i>Coriandrum sativum</i>	54
3.2.3.	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas	55
3.2.4.	Identificação dos compostos orgânicos voláteis	56
3.3.	MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS E DO SURFACTANTE	57
3.3.1.	Purificação da quitosana	57
3.3.2.	Purificação do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato).....	58
3.3.3.	Cromatografia por exclusão de tamanho – Método Absoluto	58
3.3.4.	Cromatografia por exclusão de tamanho – Método Relativo	59
3.3.5.	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	60
3.3.6.	Titulação potenciométrica	60
3.3.7.	Titulação condutométrica.....	61

3.3.8.	Espectroscopia na região do infravermelho.....	61
3.3.9.	Polarimetria	61
3.4.	FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS PELA TÉCNICA LbL.....	62
3.4.1.	Nanoemulsão seguida do revestimento com quitosana	62
3.4.2.	Formulação 1- Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol.....	62
3.4.3.	Formulação 2 - Otimização do <i>template</i> aniônico seguida da formação das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol.....	63
3.4.4.	Formulações 3 e 4- Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol ou 1-decanol	65
3.5.	FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS PELA TÉCNICA DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL	65
3.5.1.	Formulação 5 – Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol	65
3.5.1.1.	Delineamento experimental	65
3.5.2.	Formulações 6 e 7- Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo linalol	67
3.6.	TÉCNICA DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	67
3.6.1.	Microscopia confocal de varredura a laser	67
3.7.	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS.....	68
3.7.1.	Potencial zeta (ζ)	68
3.7.2.	Microscopia eletrônica de varredura.....	68
3.7.3.	Espalhamento de luz dinâmico.....	69
3.7.4.	Espectrofotometria na região do UV-Vis.....	69
3.7.5.	Análises termogravimétricas.....	69
3.7.6.	Microbalança de cristal de quartzo e Microscopia de força atômica.....	70
3.8.	EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO, LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> , ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE	71
3.8.1.	Eficiência de incorporação.....	71
3.8.1.1.	Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose para o eugenol.....	71
3.8.1.2.	Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o eugenol	72

3.8.1.3. Nanocápsulas de quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o linalol e 1-decanol	72
3.8.2. Perfil de liberação <i>in vitro</i>	73
3.8.2.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose para o eugenol.....	73
3.8.2.2. Nanocápsulas de para o eugenol	74
3.8.2.3. Nanoemulsões de lauril sulfato de sódio e nanocápsulas de quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o linalol e 1-decanol	74
3.8.3. Determinação da atividade antioxidante poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)	76
3.8.4. Propriedades de superfície	77
3.8.4.1. Ângulo de contato.....	78
3.9. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	78
3.9.1. Ensaio de atividade antimicrobiana, fungos.....	78
3.9.2. Ensaio <i>ex vivo</i> para o controle de <i>Monilinia fructicola</i>	79
3.9.3. Ensaio antimicrobianos, fungos e bactérias.....	80
3.9.4. Ensaio de repelência da <i>Bemisia tabaci</i>	81
3.10. ANÁLISE DOS DADOS	82
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1. EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO COENTRO	83
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ATIVOS, LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL.....	93
4.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS DOS POLÍMEROS E DO SURFACTANTE	96
4.4. FORMAÇÃO DA NANOEMULSÃO E DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS.....	106
4.4.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol.....	108
4.4.2. Otimização da nanoemulsão e formação das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol	114
4.4.3. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol ou 1-decanol	119
4.4.4. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol	129

4.4.5. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo linalol e 1-decanol	137
4.5. EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO, LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> , ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE	140
4.5.1. Eficiência de incorporação.....	141
4.5.1.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol	141
4.5.1.2. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol e 1-decanol	142
4.5.1.3. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol, linalol e 1-decanol	143
4.5.2. LIBERAÇÃO <i>in vitro</i>	144
4.5.3. Determinação da atividade antioxidante	154
4.5.4. Propriedades de superfícies	160
4.6. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	166
4.6.1. Ensaio de atividade antimicrobiana - <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma</i> sp, <i>Gliocladium</i> sp e <i>Candida albicans</i>	166
4.6.2. Ensaio <i>ex vivo</i> para o controle de <i>Monilinia fructicola</i>	168
4.6.3. Ensaio de atividade antimicrobiana - <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	170
4.6.4. Ensaio de repelência da <i>Bemisia tabaci</i>	185
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	187
REFERÊNCIAS	190
APÊNDICE 1	204
ANEXO 1	217
ANEXO 2	217

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos data de cerca de dez mil anos atrás, sendo que homens e mulheres modificavam ecossistemas naturais para ambientes cultivados, impulsionando o crescimento populacional (MAZOYER; ROUDART, 2010). A agricultura tornou-se uma das principais atividades econômicas da sociedade moderna. Entretanto, foi a partir de 1960 que o processo tradicional de trabalho e organização foi profundamente modificado. A partir do final da Segunda Guerra Mundial algumas indústrias passaram a direcionar a produção de agentes químicos, até então utilizados em armas químicas e biológicas, para o controle de pragas e doenças agrícolas. Esses agentes químicos, em conjunto com sementes híbridas e as novas tecnologias mecânicas, fizeram parte do projeto da revolução verde para aumentar a produtividade e diminuir a fome no mundo, principalmente em países menos desenvolvidos. Desde então o uso intensivo de agentes químicos se consolidou no manejo de pragas e doenças para manter a qualidade e a quantidade dos alimentos (MATOS, 2010; MAZOYER; ROUDART, 2010).

Algumas pragas e doenças agrícolas podem causar danos irreparáveis com perdas parciais ou totais das plantações. Entre as pragas, destacam-se *Euschistus heros* (percevejo marrom), *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) e a *Bemisia tabaci* (mosca branca) (MAPA, 2018). Esta última acomete várias culturas agrícolas, como, por exemplo, feijão, algodão, soja e tomate em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, causando danos severos nas plantações (WILLIS, 2017). Algumas doenças agrícolas podem ser causadas por fungos e bactérias, um exemplo é o fungo *Monilinia fructicola* responsável pela podridão parda em frutos como pêssegos, nectarinas e ameixas (MAY-DE MIO *et al.*, 2011). Já no caso das bactérias, um exemplo é a *Escherichia coli*. Algumas cepas dessa bactéria podem interagir com as células das plantas, permitindo sua ancoragem na superfície, onde podem se multiplicar e serem transmitidas para os seres humanos por meio da ingestão desses alimentos causando danos à saúde ou até mesmo a morte (ROSSEZ *et al.*, 2014). Nesta direção, se faz necessário o manejo desses organismos patogênicos por meio de metodologias mais seletivas e menos tóxicas para os seres vivos.

Para controlar essas pragas e doenças utiliza-se a aplicação de agentes químicos. No entanto, seu uso contínuo e a alta persistência no ecossistema resultam em danos ambientais e, principalmente, danos à saúde da população exposta e

consumidora (SPARKS, NAUEN, 2015). Devido a esses fatores foi estimulado movimentos pró ambientais em busca de alternativas sustentáveis, tendo como uma possibilidade o uso de biopesticidas, que variam de tecnologias microbianas a botânicas. Entre as plataformas botânicas, os óleos essenciais têm se tornado uma alternativa relevante (SEIBER *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis que apresentam amplo espectro de atividades biológicas incluindo atividades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, repelentes e inseticidas (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008; SEOW *et al.*, 2014; ASBAHANI *et al.*, 2015; NAZZARO *et al.*, 2017). As atividades biológicas dos óleos essenciais podem ser consequência da presença de mais de uma substância, ou em alguns casos, o composto majoritário pode ser o responsável pela atividade observada (BILIA *et al.*, 2014). Em linhas gerais, entre os óleos essenciais responsáveis por algumas atividades anteriormente mencionadas, cita-se os obtidos de *Coriandrum sativum* e o *Syzygium aromaticum*.

A planta *Coriandrum sativum*, mais conhecida por coentro, é amplamente utilizada na culinária brasileira. A composição do seu óleo essencial varia de acordo com a parte da planta da qual é extraído (SATYAL; SETZER, 2020). O linalol, geralmente encontrado nas sementes/frutos, é um monoterpeneo oxigenado amplamente empregado em cosméticos e alimentos (APROTOSOAI *et al.*, 2014). Por outro lado, nas folhas pode ser encontrado o 1-decanol, que é um álcool graxo empregado como surfactante em indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Ambos, são descritos como substâncias com atividades antibacterianas frente à bactérias gram-negativas e gram-positivas, como *Shewanella putrefaciens* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente (MUKHERJEE *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2020).

Para a planta *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecida como cravo da índia, um dos principais compostos encontrado no seu óleo essencial é o eugenol (MARCHESE *et al.*, 2017). Devido à sua natureza lipofílica e estrutura química, essa molécula pode atuar como um potencial agente antimicrobiano, repelente e inseticida (ZERINGÓTA *et al.*, 2013; MARCHESE *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2018). Entretanto, esses óleos essenciais ou mesmo os compostos isolados, apresentam baixa solubilidade em água, podem ser voláteis, bem como se decompõem quando expostos ao calor, umidade, luz ou oxigênio (TUREK; STINTZING, 2013). Entre as estratégias para reduzir as problemáticas anteriormente mencionadas, tem-se a encapsulação dessas substâncias (SAIFULLAH *et al.*, 2019).

Materiais em escala nano ou micrométrica apresentam excelentes propriedades e aplicações devido às suas características químicas, físicas e biológicas (LEE, 2008). Nanocápsulas poliméricas são utilizadas para proteger substâncias ativas, além de diminuir sua perda e aumentar sua eficiência por promover uma liberação mais controlada. Esses sistemas podem ser obtidos por vários métodos, os mais comuns são: nanoprecipitação, emulsificação por difusão de solvente, coacervação, *Layer-by-Layer* (LbL) e deposição interfacial de polímero pré-formado (REIS *et al.*, 2006; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; RAO; GECKELER, 2011). O método de autoassociação LbL é baseado na formação de filmes ou nanocápsulas, a partir de um substrato, por interações iônicas via adsorção irreversível de polieletrólitos (DECHER, 1997). Alguns polímeros iônicos podem ser utilizados, como a quitosana e a carboximetilcelulose.

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido por meio da desacetilação parcial da quitina. Em meio ácido, abaixo do seu pK_a (6,5), os grupos amino são protonados ($-NH_3^+$) originando um polieletrólito catiônico solúvel (MUN *et al.*, 2006; DASH *et al.*, 2011; CHIAPPISI; GRADZIELSKI, 2015), que é capaz de interagir ionicamente com substratos aniônicos. Um polímero de carga oposta, biodegradável e não tóxico que pode interagir ionicamente com a quitosana é a carboximetilcelulose (ZHANG, *et al.*, 2013). É uma molécula formada pela carboximetilação parcial das unidades de β -D-glucopiranosose da celulose. O caráter aniônico se deve à formação de grupos carboxilato por meio da desprotonação que ocorre em pH acima de seu pK_a (próximo a 4) (TOĞRUL; ARSLAN, 2003; ZHANG, *et al.*, 2013). Dessa maneira, podem ser construídas diversas camadas poliméricas sobre um substrato e a liberação do ativo pode ser modulada.

Uma outra estratégia para produção de nanocápsulas é a técnica de deposição interfacial envolvendo a mistura de uma fase orgânica composta por solvente, polímero, ativo, óleo e tensoativo lipofílico, em outra fase aquosa, contendo tensoativo hidrofílico e água (FESSI *et al.*, 1989). Um polímero que pode ser utilizado na produção de nanocápsulas é o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) mais conhecido como PHBV. É um poliéster que pode ser produzido por cepas bacterianas, altamente biocompatível, biodegradável e não tóxico (TEBALDI *et al.*, 2019). Pertence à classe dos poli(hidroxicanoatos) (PHAs), sendo constituído por dois monômeros, o ácido hidroxibutírico e o ácido hidroxivalérico. A presença das unidades de hidroxivalerato proporcionam melhores propriedades mecânicas, térmicas, de

biocompatibilidade e biodegradabilidade quando comparado ao homopolímero poli(hidroxibutirato) (PHB) (RIVERA-BRISO; SERRANO-AROCA, 2018).

Com base no apresentado, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanocápsulas ou microcápsulas de biopolímeros contendo os compostos eugenol, linalol e 1-decanol minimizando problemas como a alta volatilidade e baixa solubilidade dos compostos. Além disso, a avaliação dessas nanocápsulas frente a organismos patogênicos tendo como possibilidade uma metodologia alternativa e de baixo impacto ambiental.

Dessa forma, o trabalho encontra-se estruturado da seguinte maneira: primeira etapa: identificação dos compostos majoritários, linalol e 1-decanol, presentes nas sementes e folhas do *C. sativum*, respectivamente. Segunda etapa: purificação e caracterização dos polímeros quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Terceira etapa: desenvolvimento das formulações e suas caracterizações, sendo a primeira formulação e segunda formulação obtidas por meio da técnica LbL com os polímeros quitosana e carboximetilcelulose e utilizando como material de núcleo o eugenol, essas duas formulações diferem pela obtenção de nanoemulsões e nanocápsulas mais uniformes na segunda formulação. A terceira formulação e a quarta formulação também foram obtidas por meio do método LbL com quitosana e carboximetilcelulose e como material de núcleo foi utilizado o linalol e o 1-decanol, respectivamente. As formulações seguintes (quinta, sexta e sétima) foram obtidas por meio do método de deposição interfacial e utilizando o polímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), além disso foram utilizados os compostos eugenol, linalol e 1-decanol, respectivamente, como material de núcleo. Quarta etapa: determinação da eficiência de incorporação e liberação *in vitro* para todas as formulações, atividade antioxidante e propriedades superficiais somente para a segunda formulação. E por fim, na quinta etapa foram apresentados os resultados para as atividades biológicas das sete formulações frente a fungos, bactérias e insetos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi identificar os componentes do óleo essencial de *C. sativum* e desenvolver nano e microcápsulas contendo substâncias como linalol, 1-decanol e eugenol revestidas com biopolímeros para o controle de organismos patogênicos.

1.2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Obter o óleo essencial das sementes e das folhas da planta coentro;
- Identificar os constituintes do óleo essencial das sementes e das folhas do coentro;
- Purificar e caracterizar os polímeros usados na produção das nano e microcápsulas;
- Desenvolver as nanocápsulas e microcápsulas de quitosana e carboximetilcelulose pela técnica *Layer-by-Layer*;
- Desenvolver as nanocápsulas de PHBV pela técnica de deposição interfacial;
- Caracterizar os sistemas de nano ou microcápsulas;
- Determinar a eficiência de incorporação dos ativos presentes nas nanocápsulas
- Analisar a liberação *in vitro* dos ativos presentes nas nano e microcápsulas;
- Analisar a atividade antioxidante dos sistemas desenvolvidos;
- Analisar a atividade biológica dos sistemas desenvolvidos frente a fungos e bactérias;
- Analisar a atividade repelente dos sistemas desenvolvidos frente a insetos como a mosca branca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A AGRICULTURA E OS AGROTÓXICOS

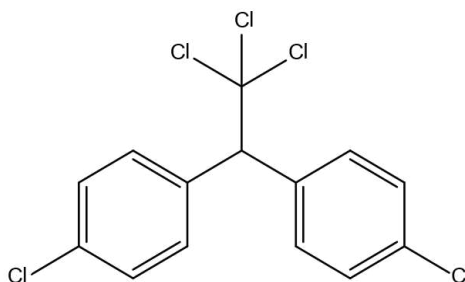
A arte de cultivar alimentos é uma das práticas mais antigas do mundo. Alguns historiadores afirmam que seu início foi no período neolítico (10.000 a 4.000 anos a.C.), após o homem descobrir a utilidade dos metais como cobre, estanho e ferro para produzir ferramentas de trabalho (MAZOYER; ROUDART, 2010).

No Brasil a agricultura passou por várias etapas até se tornar a grande potência vista hoje em dia. Seu início foi com os povos indígenas, que cultivavam a agricultura de subsistência e a extração de alimentos provenientes da vegetação local. Em seguida, junto às atividades extrativistas no período de colonização, foram introduzidos grandes cultivos de cana de açúcar no nordeste brasileiro. Após esse produto perder competitividade no mercado externo e ocorrer a queda de produção, houve o interesse na plantação de café no sudeste brasileiro. Mas, foi a partir de 1960, com novas tecnologias e com um mercado em ampla expansão, que os olhos se voltaram para o centro-oeste brasileiro impulsionando a cultura de soja. Dessa forma, o Brasil passou de importador para um grande exportador de alimentos (REIFSCHNEIDER *et al.*, 2017; BOLFE *et al.*, 2018). Embora a trajetória de desenvolvimento signifique um crescimento econômico, junto do desenvolvimento foram observados sérios danos ambientais provocados pela incorporação de produtos que diminuem a perda dos alimentos por pragas ou doenças.

O uso de agentes químicos na agricultura se intensificou após o lançamento na década de 60, da política chamada de “Revolução Verde” inicialmente na Europa e espalhando-se para vários países menos desenvolvidos. O intuito era de expansão da produção de alimentos e diminuição de problemas sociais advindos do fim da Segunda Guerra Mundial, por meio da inserção de novas tecnologias, estimulando o uso de máquinas agrícolas, equipamentos modernos, fertilizantes, sementes melhoradas geneticamente e uso intensivo de agrotóxicos (KHUSH, 2001). Contudo, o que se observou foi a não erradicação da fome. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2019 a falta de alimento afetou 690 milhões de pessoas no mundo (FAO, 2020). Além disso, essa política de desenvolvimento trouxe sérios problemas ambientais e sociais, incluindo poluição, desmatamento e o êxodo rural (CLEAVER, 1972).

O primeiro agente químico, dicloro-difenil-tricloroetano (FIGURA 1), popularmente conhecido como DDT, foi sintetizado acidentalmente em 1874 por Othmar Zeidler. Esse composto foi amplamente utilizado na Primeira e Segunda Guerra Mundial como arma química. Entretanto, em 1939 Paul Muller descobriu suas propriedades inseticidas e, a partir daí, foi introduzido em larga escala no combate de pragas (CHALUPSKY, 2012). Poucos anos depois, o seu uso foi associado ao desequilíbrio ambiental, provocando doenças e mortes de humanos e animais. Seu uso foi proibido em vários países nos anos 70. No Brasil, apesar de ter sido proibido em 1985, seu uso ainda foi observado nos anos subsequentes para o controle da malária e leishmaniose (FLORES *et al.*, 2004).

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DICLORO-DIFENIL-TRICLOROETANO (DDT)

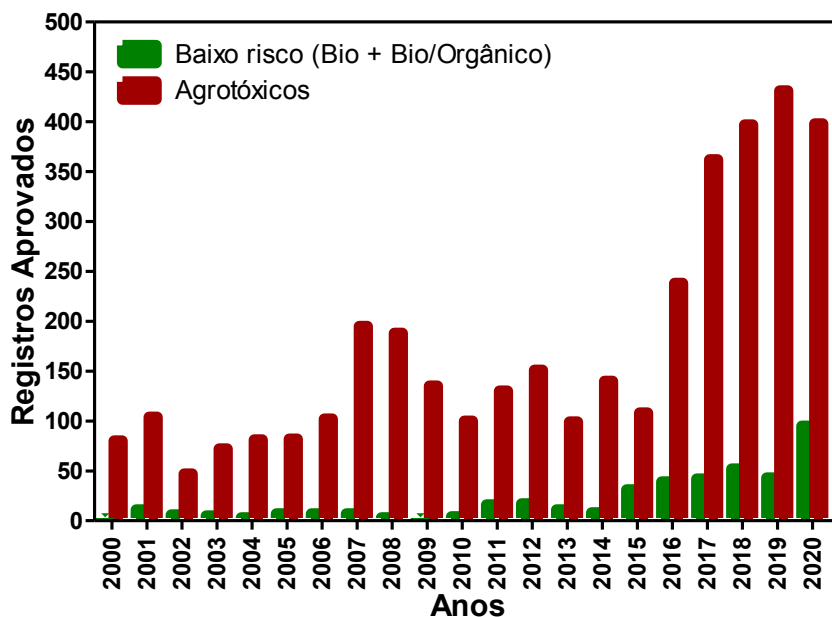


FONTE: O autor (2021)

Segundo Albuquerque e colaboradores (2016), o Brasil é o país com maior consumo de pesticidas do mundo (cerca de 20% do total). Possui cerca de 130 indústrias de agrotóxicos que fabricam cerca de 2400 produtos diferentes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Os órgãos responsáveis pela avaliação e liberação do uso desses pesticidas são o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis do Meio Ambiente (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Saúde.

Como pode ser observado na FIGURA 2, a partir de 2017 houve um aumento considerável da aprovação de novos agrotóxicos no Brasil. Entre os registros estão produtos formulados a partir de ativos sintéticos e a partir de produtos biológicos, microbiológicos, bioquímicos, extrato vegetal, regulador de crescimento, semioquímicos e outros denominados de baixo risco (MAPA, 2020). Em 2020, foi registrado cerca de 398 agrotóxicos e 95 produtos de baixo risco.

FIGURA 2 - TOTAL DE AGROTÓXICOS E PRODUTOS DE BAIXO RISCO REGISTRADOS E APROVADOS POR ANO NO BRASIL NO PERÍODO DE 2000 A 2020



FONTE: MAPA (2021)

Entre os pesticidas mais utilizados no controle de pragas e doenças agrícolas em nosso país, encontram-se os herbicidas (glifosato, 2,4-D e paraquate) fungicidas (mancozebe) e inseticida (acefato) (MORAES, 2019). Muitos deles são frequentemente encontrados na água e nos alimentos que consumimos diariamente, além de estarem presente no ar. Quando liberados no ecossistema, os pesticidas geram compostos intermediários que muitas vezes são mais tóxicos que a mistura inicial. Além do mais, no geral eles não são seletivos para o alvo proposto, ou seja, ocasionam a morte de organismos não-alvos. Estudos recentes indicam que várias pragas desenvolveram resistência a agrotóxicos, trazendo mais um problema para o meio ambiente (KOHLE; TRIEBSKORN, 2013; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Em adição, o risco associado ao seu uso torna-se perigoso para os seres vivos, devido à toxicidade, grau de contaminação e tempo de exposição (KOHLE; TRIEBSKORN, 2013) e podem causar doenças neurológicas, câncer, entre outros malefícios (KUMAR *et al.*, 2012; MAHMOOD *et al.*, 2016).

A composição dos agrotóxicos baseia-se em uma mistura de substâncias químicas (princípio ativo) com materiais inertes chamados de adjuvantes ou aditivos. Mesnage e colaboradores (2014) realizaram testes de toxicidade em células humanas com herbicidas, inseticidas e fungicidas, comparando os princípios ativos das formulações e as formulações. Em relação ao princípio ativo de cada pesticida, todos

apresentaram altos níveis de toxicidade, sendo os fungicidas os mais tóxicos, seguido dos herbicidas e inseticidas. Além do mais, os autores observaram que o glifosato foi um dos produtos mais tóxicos testados, sendo esse um dos mais utilizados no Brasil como mencionado anteriormente, e que 89% das formulações se apresentaram mil vezes mais tóxicas que apenas o princípio ativo. Essa descoberta mostra que a exposição a esses agrotóxicos pode ser muito mais elevada, uma vez que normalmente os cálculos de ingestão diária aceitável são realizados baseados apenas no princípio ativo, ignorando os outros componentes da formulação (MESNAGE *et al.*, 2014; MESNAGE; ANTONIOU, 2018).

Embora o uso de agrotóxicos seja um fator relevante no desequilíbrio ecológico que observamos hoje em dia, existem várias outras contribuições para essas alterações nos processos naturais do ecossistema. Entre os principais exemplos encontram-se a poluição industrial, a falta de políticas públicas adequadas e a destruição de florestas por meio de queimadas e desmatamentos. Todos esses exemplos contribuem para que tenhamos um aumento do efeito estufa, morte de organismos essenciais para a sobrevivência e diversidade das florestas e vida marinha, alteração dos valores de pH em rios, diminuição da qualidade do ar e, em consequência a tudo isso, o surgimento de novas pragas ou doenças, ou mesmo o reaparecimento de organismos patogênicos, muitas vezes mais resistentes, que são prejudiciais aos seres vivos (BURSZTYN; BURSHTYN, 2013).

Neste sentido, apesar dos inúmeros danos ao meio ambiente e às pessoas expostas, os pesticidas ainda são “benéficos” para preservar, mesmo que de forma insatisfatória, a produção alimentícia mundial. Essas misturas agem nas culturas agrícolas ou nos alimentos para controlar, evitar ou destruir organismos patogênicos, incluindo insetos, ervas daninhas, vírus, fungos e bactérias.

2.2. ORGANISMOS PATOGENICOS

2.2.1. Fungos causadores de doenças em alimentos e humanos

Os fungos são micro-organismos heterotróficos unicelulares (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos). Em geral, se originam nos esporos (reprodução sexuada) ou nos conídios (reprodução assexuada), principais responsáveis pela propagação das espécies. Para germinarem necessitam de calor e ambiente úmido

resultando na formação de tubos germinativos que se ramificam formando os micélios. Os micélios fazem parte do sistema vegetativo dos fungos, responsáveis pelo seu desenvolvimento e absorção dos alimentos (BEATRIZ; CAMBAZA, 2015, HOGG, 2015).

No Brasil são reportados próximo a seis mil espécies de fungos, distribuídas em 1246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões (MAIA *et al.*, 2015). Entre as inúmeras espécies, serão enfatizadas as espécies utilizadas neste trabalho, como o *Aspergillus niger*, a *Candida albicans*, o *Gliocladium* sp, o *Trichoderma* sp e o *Monilinia fructicola*.

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é uma das espécies mais comuns do gênero *Aspergillus* e mundialmente distribuída com capacidade de se desenvolver em diversos tipos de substratos. É utilizado nas indústrias, em processos de fermentação, para a produção de ácidos orgânicos, como o cítrico e o glucônico, e enzimas hidrolíticas como lipases e amilases. Entretanto, pode provocar alergias nos seres humanos devido à exposição aos esporos presentes no ar (GAUTAM *et al.*, 2011). Este fungo pode produzir micotoxinas, sendo a relacionada com estas espécies a ocratoxina, que pode causar risco à saúde de animais e humanos. Além do mais, nas culturas agrícolas pode estar associado à doença chamada de mofo-preto responsável pela deterioração de alimentos (GAUTAM *et al.*, 2011; ABARCA *et al.*, 2019).

A espécie *Candida albicans* é considerada um fungo do tipo levedura polimórfico e diploide, faz parte da microbiota humana e é comumente encontrada no trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário humano (YANG; RAO, 2019). É uma espécie que apresenta grande adaptação, podendo se desenvolver em ambientes diferentes do corpo humano, dependendo da disponibilidade de nutrientes, variação de temperatura e pH. Geralmente é um fungo comensal inofensivo que pode se transformar em um organismo oportunista em indivíduos imunocomprometidos ou que apresente imunodeficiências (YANG; RAO, 2019).

Com o intuito de descobrir alternativas para o controle do *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, Pinto e colaboradores (2017) desenvolveram metodologias laboratoriais do óleo essencial da flor *Thapsia villosa* e seus componentes majoritários, limoneno e metileugenol. Ainda que as substâncias isoladas tenham apresentado uma maior atividade antifúngica frente aos dois fungos citados anteriormente, um efeito semelhante, mas menos pronunciado também foi observado

para o óleo essencial, indicando que as substâncias naturais apresentam potencial ação fungicida, tornando-se alternativas a agentes químicos tóxicos.

Os fungos das espécies *Gliocladium* sp e *Trichoderma* sp são amplamente distribuídos no solo e nas vegetações. Esses fungos podem ser contaminantes em plantações florestais e em produções de cogumelos comestíveis (SUADA *et al.* 2015; GUERRA *et al.*, 2019). Embora a literatura os relate como fitopatogênicos, nos últimos anos houve um aumento nas pesquisas para utilizá-los como antagonistas microbianos em plantas, substituindo ou minimizando o uso de agentes químicos tóxicos (ALIZADEH *et al.*, 2020).

Por outro lado, o *Monilinia fructicola* é um fungo altamente patogênico, responsável por causar a podridão parda em pêssegos, nectarinas, ameixas, damasco e ameixa-amarela. Este patógeno é responsável por infectar a planta durante o período de floração e durante a fase de frutificação, podendo permanecer de forma latente no fruto, apresentando sintomas apenas quando o ambiente se torna favorável ou no amadurecimento dos frutos, por exemplo, na pós-colheita (MAY-DE MIO *et al.*, 2011). O fungo consegue adentrar a epiderme intacta do fruto por meio de enzimas que destroem essa camada. As formas de controle ainda são predominantemente com defensivos agrícolas sintéticos, no entanto, esse micro-organismo está se tornando resistente à fungicidas (MAY-DE MIO *et al.* 2011; DOWLING *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019).

Recentemente surgiram alguns estudos utilizando substâncias naturais para o manejo desse fitopatógeno. Como por exemplo o estudo realizado por Xu e colaboradores (2021). Esses autores avaliaram a atividade fungicida de quatro óleos essenciais (óleo essencial de melaleuca, tomilho, alecrim e limão) contra o fungo *Monilinia fructicola* em pêssegos e observaram que o óleo essencial de melaleuca foi altamente eficiente no controle do fitopatógeno. Possivelmente o óleo atua rompendo as membranas celulares do fungo causando um rápido aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular. Nesta direção, conclui-se que os óleos essenciais são excelentes possibilidades para a diminuição do uso de agrotóxicos, pois além de não agredirem o meio ambiente em comparação com os agrotóxicos, são eficientes em baixas concentrações.

Além dos fungos, existem várias bactérias que podem ser danosas aos seres humanos por estarem presentes nos alimentos ou mesmo no organismo humano.

2.2.2. Bactérias causadoras de doenças em humanos

As bactérias são micro-organismos unicelulares e procariontes. Embora sejam responsáveis por inúmeras doenças, possuem grande importância no equilíbrio ecológico (HOGG, 2015). Existem as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem a parede espessa formada por moléculas de açúcares e aminoácidos. Por outro lado, as Gram-negativas apresentam paredes mais finas, além de uma camada externa, semelhante a uma membrana plasmática (HOGG, 2015). Como exemplos de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa podem ser citadas a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*, respectivamente.

A *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno com grande impacto na saúde humana. Possui a capacidade de infectar quase todos os sistemas do corpo humano, muitas vezes com consequências fatais (POOLMAN; ANDERSON, 2018).

Por outro lado, a *Escherichia coli* que tem formato de bastão é um micro-organismo que vive de maneira comensal no intestino de humanos e animais. Entretanto, pode se comportar como oportunista causando graves doenças, desde infecções do trato urinário, meningite neonatal até doenças no sistema nervoso central (POOLMAN; ANDERSON, 2018).

Dependendo das condições de manuseio, estocagem ou processamento dos alimentos esses dois micro-organismos podem estar associados à contaminação alimentícia, e consequentemente podem vir a causar doenças nos seres humanos. Buscando uma alternativa natural para evitar a infecção por essas bactérias, Wang e colaboradores (2020) realizaram experimentos com o óleo essencial de gengibre e observaram excelentes atividades antibacterianas sugerindo que o mecanismo de ação do óleo nas bactérias é por meio do rompimento da membrana celular. Além disso, observaram que ao aumentar a concentração do óleo de gengibre as atividades metabólicas das bactérias foram suprimidas. Os autores sugerem que o uso desse óleo essencial pode ser adequado para a preservação de alimentos.

Nesta direção, os óleos essenciais podem ser considerados uma alternativa plausível para minimizar o uso de agentes químicos tóxicos e, dessa forma, controlar inúmeros tipos de micro-organismos danosos às culturas alimentares. O que se faz necessário são estudos para o desenvolvimento de formulações e a sua implementação de fato nas lavouras.

Em conjunto com as doenças ocasionadas por fungos, bactérias e vírus, existem inúmeros insetos nocivos para as plantações agrícolas. Além serem prejudiciais, podem provocar doenças nas plantações por meio da transmissão de vírus e fungos, um exemplo é a *Bemisia tabaci*.

2.2.3. Insetos nocivos causadores de danos às plantações

Os insetos fazem parte do maior grupo (artrópodes) de animais que habitam a terra. Atualmente, cerca de um milhão de espécies de insetos são conhecidas. Podem ser extremamente importantes como as abelhas e bicho-da-seda e nocivos como o mosquito prego e mosquito da dengue (vetores de doenças para o homem) (STORK, 2018).

Em relação aos insetos nocivos, há os que causam sérios danos às plantações de alimentos, influenciando diretamente a quantidade e qualidade do produto. Entre os inúmeros insetos nocivos, destaca-se a *Bemisia tabaci*, mais popularmente conhecida como mosca branca (FIGURA 3). A *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), é um inseto que ataca mais de 600 espécies de plantas hospedeiras em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (PERRING, 2001; BARRO *et al.*, 2011).

FIGURA 3 - IMAGEM DE UM GRUPO DE INSETOS ADULTOS DA *Bemisia tabaci* EM FOLHAS DE *Physalis peruviana*



FONTE: O autor (2021) e ampliação: Science History Images (2005)

A *B. tabaci*, no Brasil está entre as pragas que mais provocam danos às culturas agrícolas (MAPA, 2020). Ao sugar a seiva das plantas causa lesões e transmite alguns tipos de vírus. Além disso, pode comprometer a fotossíntese das

plantas por meio do crescimento de fungos, devido à presença de toxinas açucaradas que são depositadas nas folhas durante a sucção da seiva pelo inseto (SANI *et al.*, 2020). As culturas agrícolas mais afetadas são: feijão, soja, algodão e tomate (MORALES; ANDERSON, 2001). Geralmente, para o seu controle são necessários teores elevados de agrotóxicos e de forma contínua. Essa prática pode levar à sua resistência aos inseticidas. Além disso, a pulverização das áreas agrícolas é uma estratégia um tanto limitada, pois, geralmente, tanto as moscas adultas como as ninfas localizam-se na parte inferior das folhas das plantas, dessa forma requerem aplicações especiais ou doses mais elevadas para o seu controle (CARVALHO, *et al.*, 2017; SANI *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, com a perspectiva de minimizar o uso de agrotóxicos, surgiram alguns estudos buscando alternativas para o manejo da mosca branca. Um exemplo é o uso de substâncias naturais ou plantas que exercem atividade repelente em relação à mosca branca (TOGNI *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2017; SAAD *et al.*, 2017).

Para avaliar a repelência contra a *B. tabaci*, Carvalho e colaboradores (2017) utilizaram folhas frescas da planta da espécie *Coriandrum sativum* em tubos de olfatômetros e plantas inteiras em plantações de tomates. Os autores relataram uma expressiva repelência promovida pelo *Coriandrum sativum* nos ensaios utilizando os olfatômetros. Já nos testes em plantações de tomates consorciadas, onde duas plantas de coentro foram transplantadas a cada uma planta de tomate, eles indicaram que o *Coriandrum sativum*, promoveu uma redução do número de mosca brancas que se aproximavam dos tomateiros. Na fase de ninfa, o *Coriandrum sativum* promoveu uma diminuição da quantidade de mosca branca ao longo de sete semanas quando comparado com a planta de tomate na ausência de *Coriandrum sativum*.

Portanto, por meio da pesquisa anteriormente mencionada foi comprovado cientificamente que o *Coriandrum sativum* e, possivelmente seus compostos voláteis, podem diminuir a incidência de mosca branca tanto em populações adultas como na fase de ninfa, além disso, pode agir como um repelente natural de insetos, como a mosca branca.

Diante do exposto e para diminuir a dependência de agentes químicos tóxicos nos sistemas de produção agrícola, o uso de biopesticidas vem ganhando destaque em pesquisas científicas. Biopesticidas podem ser classificados como produtos químicos naturais ou seus derivados, com baixa toxicidade para organismos não-alvo e

mamíferos, menor persistência no meio ambiente, podem ser usados em agricultura orgânica e são mais seguros para os trabalhadores (SEIBER *et al.*, 2014). Nos últimos anos vários biopesticidas foram registrados na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), entre eles estão o estragol, L-carvona, citronelal e verbenona que são substâncias naturais presente nos óleos essenciais extraídos de plantas (SEIBER *et al.*, 2014).

2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são frações líquidas voláteis compostas por uma mistura complexa de metabólitos secundários que podem ser sintetizados em diferentes partes das plantas, incluindo flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e cascas. Essas substâncias contribuem amplamente para o ciclo de vida das plantas, sendo um dos responsáveis pelas defesas aos ataques de patógenos, herbívoros e por atraírem polinizadores e disseminadores de sementes (BAKKALI *et al.*, 2008; ASBAHANI *et al.*, 2015; MALEŠEVIĆ *et al.*, 2016).

Existem alguns fatores que influenciam o teor e a composição dos óleos essenciais, como por exemplo, a época de colheita, origem geográfica, maturação e métodos de extração (DIMA; DIMA, 2015). Os métodos de extração dos óleos essenciais são extremamente importantes para a eficiência do processo. Entre eles, cita-se a hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, enfleurage, micro-ondas e ultrassom. A hidrodestilação tornou-se um dos métodos mais simples e comuns, entretanto, é mais demorado do que a maioria dos demais métodos, tornando-o um método caro. O princípio básico do método é o arraste dos compostos voláteis, seguida de uma condensação e separação da mistura heterogênea, sendo que a temperatura utilizada se situa em torno de 100 °C (ASBAHANI *et al.*, 2015; DIMA; DIMA, 2015). Geralmente, compreende uma pequena fração mássica da matéria vegetal seca (menos de 5%) e a maioria é utilizada na sua forma complexa original, apenas 20 a 25% das amostras são quimicamente processadas para o isolamento de um composto (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Em geral, os óleos essenciais são constituídos por hidrocarbonetos e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, fenóis e éteres fenólicos). Além disso, possuem características lipofílicas, baixa densidade, geralmente são incolores e exibem odor forte e característico. Já foram relatados

cerca de 3000 óleos essenciais provenientes de 2000 plantas, dos quais 300 são comercialmente importantes (KARUPPAYIL, 2014; DIMA; DIMA, 2015). O sinergismo existente entre seus constituintes, ou mesmo alguns compostos isolados, torna-os relevantes para inúmeras aplicações farmacêuticas, alimentícias e até mesmo agrícolas como antimicrobianos, repelentes e inseticidas (SEOW *et al.*, 2014; LARIBI *et al.*, 2015).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais podem estar relacionadas com as características lipofílicas dos seus constituintes. Basicamente, essas características permitem uma interação mais intensa dos constituintes com os lipídeos da membrana celular, causando alterações na estrutura e o seu rompimento (BAKKALI *et al.*, 2008; SEOW *et al.* 2014; NAZZARO *et al.*, 2017). Como a maioria dos óleos essenciais apresentam um composto majoritário (20-80% da composição), este pode ser o responsável pela atividade biológica, ou então ela pode ser o resultado de interações aditivas e/ou sinérgicas entre os seus componentes químicos.

Em relação à atividade repelente exercida por alguns óleos essenciais, ela pode estar relacionada à presença de compostos contendo o grupo hidroxila e principalmente com o tipo de carbono que o grupo hidroxila está ligado. Nerio e colaboradores (2010) mostraram, em uma revisão, que os compostos contendo o grupo hidroxila ligado a carbonos primários, secundários e aromáticos, geralmente, promoveram repelência a vários artrópodes. Por outro lado, compostos que apresentavam o grupo hidroxila ligado a um carbono terciário, como por exemplo o linalol, α -terpineol e o limoneno, não se observou repelência frente ao inseto *Anopheles gambiae* (mosquito vetor da malária). Dessa forma, os autores indicaram a possibilidade de que o tipo de carbono onde a substituição de hidroxila se faz presente pode modular a repelência (NERIO *et al.*, 2010).

Entre os inúmeros óleos essenciais que possuem atividades biológicas comprovadas estão os óleos essenciais do coentro e do cravo da Índia (WEI *et al.*, 2019; BATIHA *et al.*, 2020). Além do mais, seus compostos majoritários também já foram relatados como responsáveis por combater organismos patogênicos como será detalhado nos textos a seguir.

2.3.1. Óleo essencial do *Coriandrum sativum*

A planta coentro (*Coriandrum sativum* L.) (FIGURA 4) pertence à família Apiaceae/Umbelliferae, é nativa da Europa Meridional, cultivada em diversas partes do mundo e amplamente utilizada na culinária de vários países (WEI *et al.*, 2019).

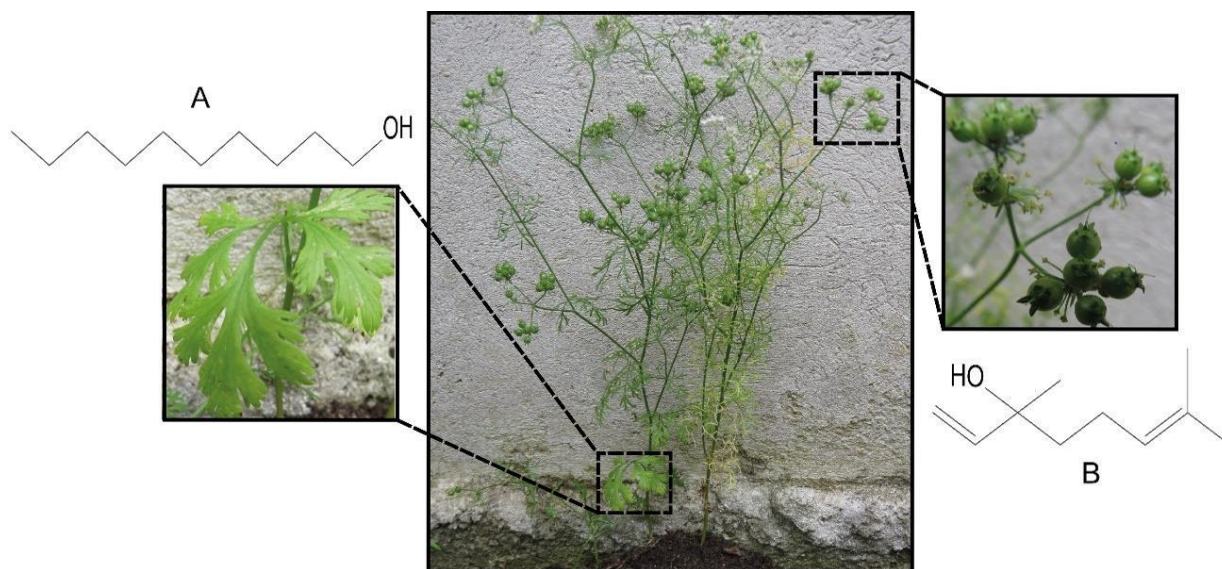
O óleo essencial e alguns constituintes do seu óleo apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, neuroprotetora, ansiolítica, anti-inflamatória e repelente (LARIBI *et al.*, 2015). Pode ser extraído de várias partes da planta, incluindo folhas, caule, flores, pericarpo e frutos/sementes. Porém, existem diferenças significativas na composição química do óleo extraído de diferentes partes do coentro. Essas diferenças na composição podem estar aliadas aos fatores como estágio de desenvolvimento da planta, parte da planta, condições de processamento e estocagem, além do método de extração (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2018).

Os constituintes majoritários do óleo essencial das folhas do coentro ainda não são bem delimitados na literatura. Alguns autores indicam que o composto encontrado em maior quantidade é o decanal (MANDAL; MANDAL, 2015), outros apontam o (2E)-decanal (WEI *et al.*, 2019) e neste trabalho foram obtidos os compostos 1-decanol (FIGURA 4A) a partir do método de extração à temperatura ambiente e o (2E)-dodecenal utilizando o método de extração em nitrogênio líquido. Essa diferença em relação ao composto majoritário pode estar associada a fatores citados anteriormente, abrangendo a forma de extração do óleo, origem geográfica e época de extração. O 1-decanol é um álcool graxo de cadeia linear contendo dez átomos de carbono, possui baixa massa molar ($158,2 \text{ g mol}^{-1}$) e solubilidade em água ($0,037 \text{ g L}^{-1}$) (National Center for Biotechnology Information, 2021).

Embora o 1-decanol seja um composto conhecido na indústria, existem poucos estudos relatando sua atividade biológica. Um exemplo é o seu uso frente à bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da doença tuberculose. De acordo com Mukherjee e colaboradores (2013) esse álcool graxo danifica o envelope celular da *M. tuberculosis* perturbando a homeostase dos íons, consequentemente causando a morte da bactéria. Nesta mesma direção, Togashi e colaboradores (2007), demonstraram que o comprimento da cadeia dos álcoois graxos pode determinar a natureza da sua ação antibacteriana. Álcoois graxos com doze ou treze carbonos em suas cadeias promoveram uma eficiente atividade bacteriostáticas, entretanto,

apresentam menor permeabilidade de íons de potássio (K^+) quando comparados com compostos como o 1-decanol.

FIGURA 4 - IMAGEM DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA *Coriandrum sativum* L., FOLHAS E SEMENTES. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO (A) 1-DECANOL E (B) LINALOL



FONTE: O autor (2021)

Em contrapartida, para as semente/frutos e pericarpo há uma concordância de que a composição majoritária do óleo essencial do coentro é o linalol (LARIBI *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2019). O linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol) (FIGURA 4B) é um monoterpene oxigenado, de baixa solubilidade em água ($1,59 \text{ g L}^{-1}$) e baixa massa molar ($154,3 \text{ g mol}^{-1}$) (National Center for Biotechnology Information, 2021). O linalol apresenta um estereocentro sendo possível a ocorrência de dois enantiômeros o (3S)-(+)-linalol e (3R)-(-)-linalol (PEREIRA *et al.*, 2008). Além de possuir atividade biológica, o linalol é empregado em diversos cosméticos, produtos de limpeza e como aditivo de alimentos (APROTOSOAIIE *et al.*, 2014).

A atividade antimicrobiana dos dois enantiômeros do linalol foi testada para a bactéria *Aeromonas hydrophila*, causadora de processos inflamatórios do estômago e intestino em seres humanos. Silva e colaboradores (2017) mostraram que apenas o (3S)-(+)-linalol foi eficiente para o controle das cepas de *A. hydrophila*. Essa diferença biológica entre os isômeros foi relacionada com as diferentes interações com alvos moleculares. As moléculas que estão envolvidas no processo farmacocinético e farmacodinâmico de fármacos, geralmente são formadas por blocos de construção

quirais, *L*-aminoácidos e *D*-carboidratos, portanto a estereosseletividade para um enantiômero pode ocorrer de forma frequentemente.

Por outro lado, Özek e colaboradores (2010) apontaram que ambos os enantiômeros do linalol, foram eficientes para o controle do crescimento do fungo *Botrytis cinerea* (50% por 48h), causador do mofo cinza em alimentos.

Em relação à repelência, alguns estudos sugerem que o óleo essencial do *C. sativum* contendo 83,6% de linalol na sua composição, atuou repelindo os insetos da espécie *Aedes albopictus* (BENELLI, *et al.*, 2013). Por outro lado, Sacchetti e colaboradores (2015) observaram que o composto atuou como um atrativo para a espécie *Bemisia tabaci*, tanto para os voláteis emitidos pela planta *Callistemon* spp, que apresenta em sua composição o linalol (constituente majoritário), como para o composto puro.

2.3.2. Óleo Essencial do *Syzygium aromaticum*

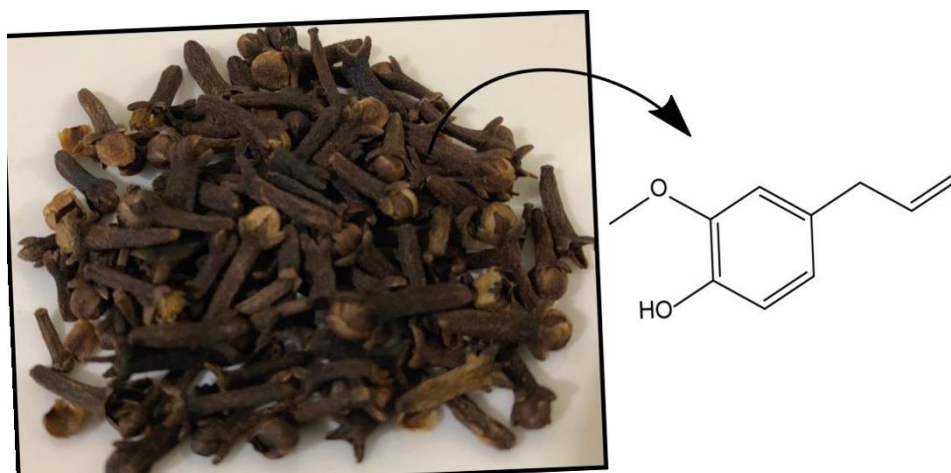
O *Syzygium aromaticum* (FIGURA 5), comumente conhecido como cravo da Índia, é uma especiaria utilizada há séculos na medicina e para a conservação de alimentos. É uma planta pertencente à família Mirtaceae, originária da Indonésia, porém, hoje em dia pode ser encontrada em vários países (BATIHA *et al.*, 2020). Possui excelentes atividades antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, repelentes e larvicidas (CORTÉS-ROJAS *et al.*, 2014). Seu composto majoritário é o eugenol, com cerca de 80-90% da composição do óleo essencial (BATIHA *et al.*, 2020).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (FIGURA 5) é um composto aromático da classe dos fenilpropanoides, lipofílico, de baixa massa molar ($164,2 \text{ g mol}^{-1}$) e solubilidade em água ($2,46 \text{ g L}^{-1}$) (National Center for Biotechnology Information, 2021). Além do cravo da Índia, pode ser encontrado nos óleos essenciais de muitas plantas, incluindo canela, manjerição e noz-moscada (MARCHESE *et al.*, 2017). Apresenta interessantes atividades biológicas, como por exemplo atividades antimicrobianas e repelente (AHMAD *et al.*, 2010; KAFLE; SHIH, 2013).

As características antimicrobianas do eugenol podem estar relacionadas à presença do grupo hidroxila fenólica na molécula. Esse grupo hidroxila pode se ligar às proteínas e inibir a ação enzimática de bactérias e fungos (MARCHESE *et al.*, 2017). Além disso, devido à sua hidrofobicidade, o eugenol pode romper membranas citoplasmáticas causando um aumento da permeabilidade não específica e, portanto,

afetar o transporte de íons e de trifosfato de adenosina nas bactérias. Em fungos pode promover alterações morfológicas, danificando a superfície das células tornando-as rugosas e ásperas. Da mesma maneira que em bactérias, nos fungos o eugenol entra na bicamada lipídica da membrana celular perturbando sua fluidez e permeabilidade podendo causar a morte dos fungos (MARCHESE *et al.*, 2017).

FIGURA 5 - IMAGEM DO BOTÃO DE FLOR SECO DO CRAVO *Syzygium aromaticum* E ESTRUTURA QUÍMICA DO EUGENOL



FONTE: O autor (2021)

Tendo em vista o exposto, mesmo com as excelentes atividades biológicas que os óleos essenciais ou o composto isolado apresentam, existem vários obstáculos para o seu uso, os principais estão relacionados com suas frequentes elevadas volatilidades, sensibilidade à luz, baixa estabilidade, baixa solubilidade em água e efeitos organolépticos devido ao aroma intenso de alguns óleos (TUREK; STINTZING, 2013). O encapsulamento dos óleos essenciais ou apenas dos compostos majoritários é uma estratégia inovadora e promissora para superar os desafios acima citados. Os sistemas em escala nanométrica melhoram a estabilidade (física, química e térmica) dos óleos ou dos compostos, pois formam uma camada protetora em sua volta, além disso podem fornecer uma liberação mais controlada e direcionada (EZHILARASI, *et al.*, 2013; ASBAHANI, *et al.*, 2015; DONSI; FERRARI, 2016; SAIFULLAH *et al.*, 2019).

2.4. NANOENCAPSULAÇÃO

O processo de encapsulação envolve o revestimento de um composto ativo ou uma mistura de compostos (material do núcleo) por um material encapsulante

(material da parede), normalmente um polímero. Desta forma, o material de parede cria uma proteção, em relação ao material do núcleo minimizando condições desfavoráveis, como alta temperatura, incidência de luz e oxidação. Com isso, possibilita o aumento da solubilidade, estabilidade e vida útil do sistema final (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; EZHILARASI *et al.*, 2013;).

Esses sistemas podem ser obtidos em escala nano (1-1000 nm) (REIS *et al.*, 2006) e dependendo do método de preparo podem ser obtidas nanoesferas ou nanocápsulas. Nanoesferas podem ser definidas como sistemas compostos por uma matriz densa que proporcionam a adsorção de moléculas em seu interior ou na sua superfície. Por outro lado, as nanocápsulas são vesículas, que podem armazenar substâncias ativas no seu interior líquido (água ou óleo) sendo envoltas por um material sólido (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Existem inúmeros métodos de preparação desses sistemas poliméricos, entre eles, os obtidos por polimerização *in situ* de monômeros e por polímeros pré-formados (REIS *et al.*, 2006). Os métodos mais clássicos utilizando polímeros pré-formados são: nanoprecipitação, autoassociação *Layer-by-Layer* (LbL), deposição interfacial, emulsificação por difusão do solvente, emulsificação por evaporação do solvente e emulsificação por coacervação (REIS *et al.*, 2006; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; EZHILARASI *et al.*, 2013). Na sequência do texto serão enfatizados os métodos que foram utilizados neste trabalho.

O método de autoassociação LbL se caracteriza pelo uso de polieletrólitos de cargas opostas sobre um substrato. Esse tipo de autoassociação facilita a produção de sistemas com multicamadas, multifuncionais e responsivos a estímulos como pH, força iônica e temperatura. A força motriz desse sistema é essencialmente coulombiana, entretanto, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem também ocorrer e estabilizar as multicamadas (KAMINSKI *et al.*, 2015; SZCZEPANOWICZ *et al.*, 2015; KAMINSKI *et al.*, 2016).

O primeiro trabalho utilizando o método LbL foi desenvolvido por Iler (1966) e consistia na autoassociação de partículas coloidais carregadas positivamente e negativamente (sílica e alumina), originando filmes finos em escala nanométrica. Entretanto, o método só ficou conhecido a partir da década de 1990 quando Gero Decher utilizou polímeros sintéticos contendo grupos ionizáveis para formar sucessivas camadas poliméricas sobre um substrato por meio de interações iônicas entre os materiais (DECHER *et al.*, 1991; DECHER; SCHMITT, 1992).

Da mesma forma que para os filmes, o mecanismo de formação das nanocápsulas é baseado em interações iônicas irreversíveis que levam à adsorção dos polieletrólitos. Para que ocorra o processo de adsorção é necessário a presença de um substrato (molde ou *template*) e que, posterior à formação da nanocápsula, pode ficar no interior ou ser removido. Estes substratos podem ser desde materiais porosos, não porosos até coloidais (GUZMÁN *et al.*, 2017).

Vários trabalhos utilizando materiais coloidais como *template* são encontrados em literatura. Kaminski e colaboradores (2016) utilizaram os polissacarídeos xantana e galactomanana para o recobrimento de lipossomas contendo o fármaco fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) responsável pelo processo de regeneração de tecidos afetados por queimaduras. Ao todo foram obtidas oito camadas de polímeros sobre o lipossoma e observado que esses sistemas podem ser adequados para liberação de ativos com baixa estabilidade.

Utilizando os mesmos biopolímeros, quitosana e alginato de sódio, Parchen e colaboradores (2020) revestiram lipossomas com carga superficial positiva. Os *templates* catiônicos foram carregados com o fármaco EGF. Os autores observaram que a liberação do fármaco foi dependente do meio em que os sistemas foram expostos. Em ambientes ácidos houve uma liberação mais pronunciada do que em meios com valores de pH próximo ao ambiente saudável.

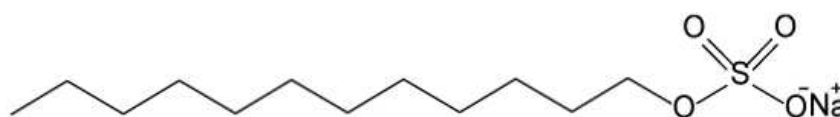
Mediante os estudos acima mencionados, é possível afirmar que esses sistemas podem ser uma alternativa versátil e viável para a liberação de inúmeros compostos ativos. Além do mais, podem ser utilizados diferentes polieletrólitos se adequando às suas futuras aplicações.

Neste sentido, é possível utilizar *templates* de nanoemulsões para formar nanocápsulas multifuncionais. As nanoemulsões são gotículas de uma fase dispersa em uma fase contínua translúcida, podendo ser de água em óleo ou de óleo em água, ou emulsões múltiplas, e são amplamente utilizadas em aplicações industriais devido à boa estabilidade cinética, baixa viscosidade e transparência (MODARRES-GHEISARI *et al.*, 2019). As emulsões tendem a separar fase ao longo do tempo, e para aumentar a estabilidade cinética, são utilizados emulsificantes, como por exemplo os surfactantes (BARNES; GENTLE, 2005).

Os surfactantes são substâncias anfipáticas/anfifílicas, moléculas compostas de uma parte hidrofóbica e a outra hidrofílica, que ao se adsorverem em uma interface alteram propriedades como tensão superficial e interfacial (COSGROVE, 2005). Essas

substâncias podem ser utilizadas em vários ramos industriais, como alimentício, cosmético, sanitário e farmacêutico. Como exemplo, o lauril sulfato de sódio (LSS) (FIGURA 6) é um surfactante aniônico constituído por 12 átomos de carbono, ligados a um grupo sulfato ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) proporcionando propriedades anfipáticas com equilíbrio hidrofílico/lipofílico (EHL) próximo a 40, indicando que sua cadeia possui característica mais hidrofílica. Apresenta baixa toxicidade (valores menores que 0,1% m V⁻¹) e pode ser utilizado em cosméticos, produtos farmacêuticos e detergentes (BONDI *et al.*, 2015).

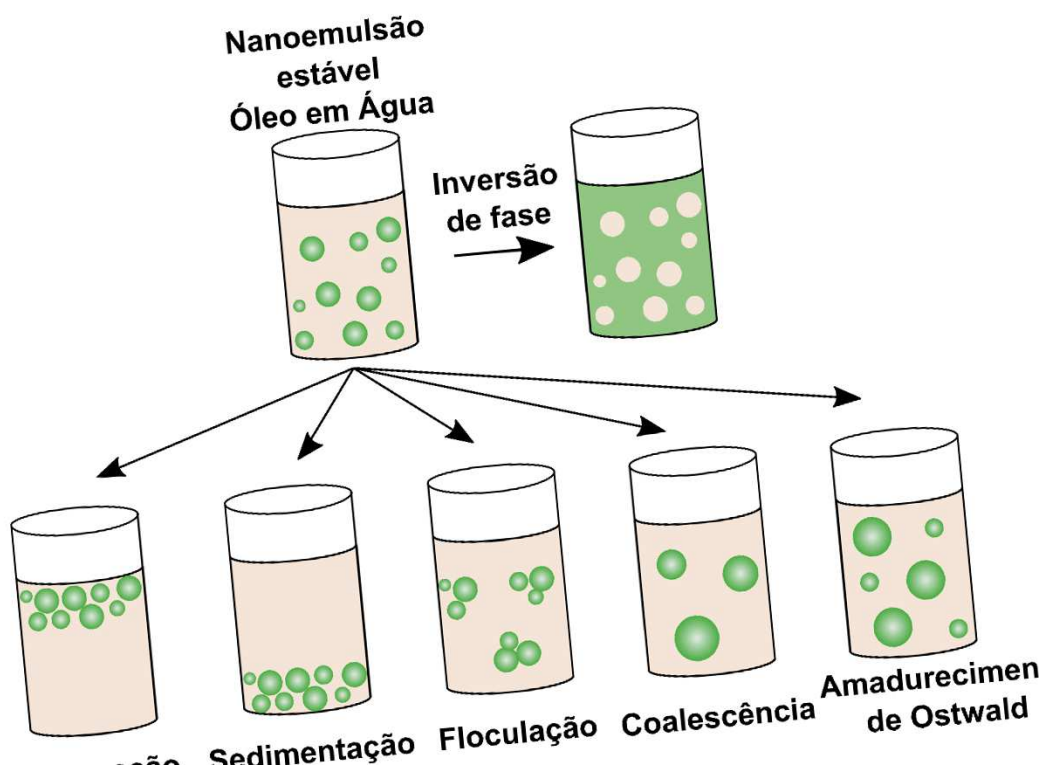
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS)



FONTE: O autor (2021)

Os surfactantes cônicos e com parâmetros de empacotamento crítico $< 0,33$, como o LSS, quando acima da sua concentração micelar crítica, se auto-organizam em estruturas chamadas de micelas quando dispersos em água (DOMINGUEZ, al., 1997). As nanoemulsões podem ser obtidas seguindo esse princípio, com a presença de uma fase oleosa para a formação das gotículas. Mesmo possuindo tamanhos nanométricos, essas nanoemulsões podem ser susceptíveis a fenômenos como cremeação, sedimentação, floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald (MCCLEMENTS, 2007). Esses fenômenos encontram-se ilustrados na FIGURA 7. A inversão de fase caracteriza-se por uma emulsão óleo em água converter-se em uma emulsão água em óleo, ou vice-versa. A cremeação ocorre quando a gotícula possui uma densidade mais baixa que a fase aquosa, enquanto a sedimentação ocorre quando a gotícula possui uma densidade maior do que a fase aquosa. Já a floculação ocorre quando duas ou mais gotículas formam um agregado. Em relação a coalescência, quando duas ou mais gotículas se fundem irão formar uma gotícula maior. No caso do amadurecimento de Ostwald, há o crescimento de gotículas maiores às custas de gotículas menores pelo processo de difusão, levando ao desaparecimento de gotículas menores (MCCLEMENTS, 2007).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS DE INSTABILIDADE MAIS COMUNS QUE OCORREM EM EMULSÕES DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA: INVERSÃO DE FASE, CREMEAÇÃO, SEDIMENTAÇÃO, FLOCULAÇÃO, COALESCÊNCIA E AMADURECIMENTO DE OSTWALD



FONTE: Adaptado de McClements (2007)

Para diminuir esses efeitos, o revestimento com polieletrólitos catiônicos ou aniônicos pode ser uma alternativa. A formação da camada, quando os polieletrólitos adsorvem na interface da gotícula, pode melhorar a estabilidade e o prazo de validade do ativo, agindo como uma barreira entre o núcleo oleoso e o ambiente externo. Os polieletrólitos que podem ser utilizados vão desde polímeros naturais até sintéticos. Entre os naturais, incluem-se as proteínas, os ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, os polissacarídeos e os derivados de polímeros naturais, como por exemplo quitosana e carboximetilcelulose (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; IDREES *et al.*, 2020).

Em relação ao método de deposição interfacial, caracteriza-se por ser uma técnica de emulsificação/solidificação originando nanocápsulas (FESSI *et al.*, 1989). O método consiste basicamente em uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica pode ser constituída pelo solvente, o polímero, o composto ativo, um óleo natural e um tensoativo de baixa hidrofiliicidade. Por outro lado, a fase aquosa compõe-se de água e um tensoativo hidrofílico. Geralmente, a fase orgânica é adicionada

sobre a fase aquosa resultando em uma mistura das duas fases (DENG *et al.*, 2020). Ao ocorrer a difusão dos solventes presentes nas duas fases ocorre o fornecimento de energia favorável para a formação de gotículas de óleo. Esse processo resulta na deposição do polímero sobre a interface das gotículas devido à redução da sua solubilidade dos componentes da mistura. Além de atuarem como núcleo para precipitação do polímero, essas gotículas servem de meio disperso para o ativo (FESSI *et al.*, 1989; REIS *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2020).

Vários polímeros podem ser utilizados para obtenção de nanocápsulas por meio deste método, e entre eles, têm-se o poli(ácido *L*-lático) (PLLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010;TEBALDI *et al.*, 2019).

2.4.1. Polímeros com potencial de aplicação em nanocápsulas

Atualmente, há uma ampla gama de polímeros utilizados para a formação de sistemas em escala nanométrica. Esses polímeros podem ser naturais, sintéticos ou semissintéticos. Embora os polímeros sintéticos sejam mais puros e apresentem melhor reprodutibilidade, normalmente os polímeros naturais são mais atrativos e ambientalmente favoráveis. Entre os polímeros naturais, incluem-se os polissacarídeos e os polímeros produzidos por micro-organismos (DENG *et al.*, 2020).

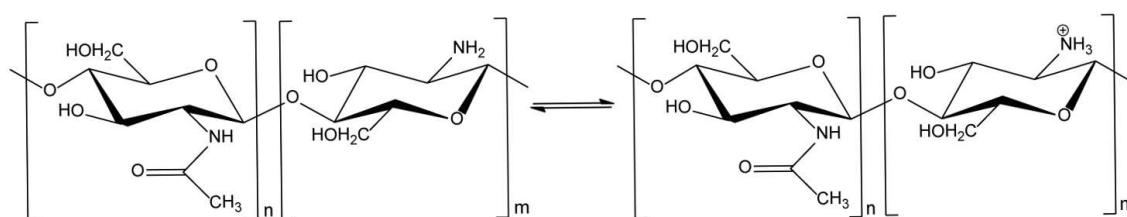
Polissacarídeos são macromoléculas constituídas por vários monossacarídeos e ligados por ligações glicosídicas. Entre os polissacarídeos pode-se citar a quitosana, que na forma de polication (DASH *et al.*, 2011) é amplamente empregada em sistemas de encapsulação de fármacos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade e a carboximetilcelulose, um derivado da celulose, solúvel em água e fisiologicamente neutro, ou seja, biocompatível (METODIEV, 2013).

A quitosana (FIGURA 8) é um polímero semissintético de cadeia linear constituída essencialmente por unidades monoméricas de β -*N*-acetil-*D*-glucosamina e β -*D*-glucosamina ligadas por ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4. Obtido principalmente, por meio da desacetilação parcial da quitina sob condições alcalinas. A massa molar e o grau de desacetilação interferem nas propriedades físico-químicas e biológicas, assim quando o grau de desacetilação é acima de 50%, a quitosana torna-se solúvel em ácidos orgânicos fracos (pH < 6,5). Ao ser solubilizada em ambiente ácido, os grupos

amino da cadeia polimérica são protonados e o polissacarídeo torna-se catiônico, permitindo a interação com diversos tipos de outras moléculas (RINAUDO, 2006; DASH *et al.*, 2011). Na FIGURA 8 podem ser observadas as unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana, representadas por n e m , respectivamente.

Geralmente, a atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada com a carga positiva do grupo amino (quando em meio ácido e abaixo do seu $pK_a < 6,5$) que interage com as cargas negativas dos lipídeos presentes nas membranas celulares dos micro-organismos. Além disso, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, pode ser amplamente utilizada na encapsulação de ativos voltados para diversas áreas incluindo a agrícola (DASH *et al.*, 2011).

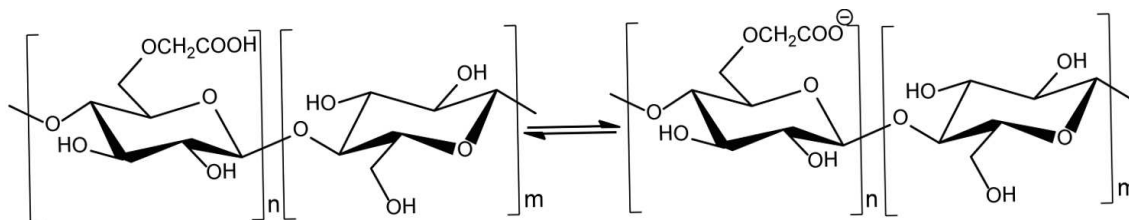
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO QUITOSANA NA SUA FORMA NEUTRA E PROTONADA. n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DA UNIDADE DE β -*N*-ACETIL-*D*-GLUCOSAMINA e β -*D*-GLUCOSAMINA, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2021)

A carboximetilcelulose (FIGURA 9) é um polímero semissintético, obtido a partir da celulose por meio de uma reação de substituição, utilizando hidróxido de sódio e ácido monocloroacético. Além de biodegradável é um polímero pouco tóxico. Sua cadeia é composta por unidades β -*D*-glucopiranosose carboximetiladas unidas por ligações 1 \rightarrow 4. É solúvel em água devido à presença do grupo carboxila ($-COOH$) que permitem a melhor permeação das moléculas de água na cadeia polimérica. Entretanto, essa característica depende do grau de substituição. O caráter aniônico é devido à formação do grupo carboxilato por meio da desprotonação que ocorre em valores de pH acima do seu pK_a (2-4) (HEINZE; KOSCHELLA, 2005). Para a carboximetilcelulose, as unidades substituídas pela carboximetila ($-CH_2COOH$) (representadas por n) e não substituídas (representadas por m) podem ser observadas na FIGURA 9.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO CARBOXIMETILCELULOSE NA SUA FORMA NEUTRA E DESPROTONADA. n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE β -D-GLUCOPIRANOSE CARBOXIMETILADAS E β -D-GLUCOPIRANOSE, RESPECTIVAMENTE

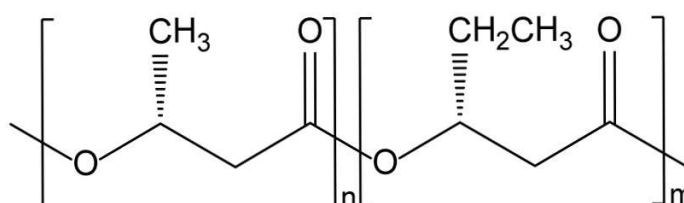


FONTE: O autor (2021)

Em relação aos polímeros naturais obtidos por meio de biotecnologia, utilizando-se de micro-organismos e com potencial aplicação em processos de nanoencapsulação cita-se o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) mais conhecido como PHBV (TEBALDI *et al.*, 2019).

O PHBV (FIGURA 10) é um poliéster pertencente à classe dos polihidroxicanoatos (PHAs), os quais são sintetizados naturalmente por micro-organismos como bactérias e acumulados na forma de grânulos intracelulares (BRITO *et al.*, 2011). Como características principais tem-se a alta biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e ser um polímero termoplástico (RIVERA-BRISO e SERRANO-AROCA, 2018; TEBALDI *et al.*, 2019). A FIGURA 10 que representa a estrutura química do PHBV, pode-se observar a presença das unidades hidroxibutirato e hidroxivalerato, representados por n e m , respectivamente.

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO COPOLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO). n E m REPRESENTAM O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DO HIDROXIBURIRATO E HIDROXIVALERATO, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2021)

Ao longo dos últimos anos vários estudos descreveram o PHBV como um material promissor para a utilização em sistemas em escala nano e micrométrica para a liberação de ativos, desde filmes até nano ou microcápsulas. Um exemplo é o estudo

realizado por Senhorini e colaboradores (2012) utilizando o PHBV para encapsular o óleo essencial de andiroba. Embora os autores não tenham realizado testes biológicos, eles indicam que o sistema de micropartículas obtido para o óleo de andiroba pode ser aplicado como inseticida em culturas agrícolas.

Todos os polímeros previamente citados são alternativas plausíveis para a formação de nanocápsulas, viabilizando a aplicação em inúmeras áreas da ciência, desde a entrega de fármacos até o controle de pragas agrícolas (ABBAS, *et al.*, 2015 e CHAI, *et al.*, 2017). Diante disso, o foco deste trabalho foi utilizar esses biopolímeros associados com os compostos isolados de alguns óleos essenciais, a fim de produzir alternativas viáveis para diminuir a dependência do uso de agrotóxicos no sistema agrícola e por meio dessas metodologias combater organismos patogênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

A quitosana ($C_6H_{11}NO_4$)_n foi obtida comercialmente da indústria Shangyu Biotech Co, Ltda (Shangyu, China). A carboximetilcelulose foi obtida da Acros Organics (Geel, Bélgica). Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) $[COCH_2CH(CH_3)O]_m[COCH_2CH(C_2H_5)O]_n$ (PHBV) (Biocycle® L110, PHB. INDUSTRIAL) foi fornecido pela Grendene. O lauril sulfato de sódio (LSS, 99%), eugenol (99%), (±)-linalol (≥97%), (-)-linalol (≥95%) 1-decanol (99%), água deuterada (D₂O, 99,9%), clorofórmio deuterado (CDCl₃), diodometano (99%), formamida (99,5%), ácido acético, acetato de sódio, ácido-6-hidróxi-2,6,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e persulfato de potássio (KPS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Alemanha, Estados Unidos). Clorofórmio (99%) foi obtido da Alphatec e clorofórmio (grau HPLC, 99,9%) foi obtido da Panreac Química. Hidróxido de sódio (NaOH, 97%), álcool metílico (99%), ácido clorídrico (HCl, 37%), n-heptano (99,3%), acetonitrila (grau HPLC) e álcool metílico (grau HPLC) foram obtidos da Vetec. Hexano (grau HPLC) foi obtido da Merck-KGaA. Álcool etílico (99%) foi obtido da Dipalcool. Acetona (99%) foi obtida da Reatec. Ácido acético deuterado (CD₃COOD, 99,5%) foi obtido da Cambridge Isotope Laboratories. Polisorbato-80 (Tween 80) foi obtido da CRQ Química. Lecitina de soja foi obtida da Dicas Cosméticos. Triglicérides de ácido cáprico/caprilíco foi obtido da Croda Química. As nectarinas (*Prunus persica* var. *nucipersica*) da variedade Sungold foram obtidas na Central de abastecimento do Paraná em Curitiba (CEASA) vindas de Santa Catarina, Brasil. As sementes e mudas de coentro foram obtidas comercialmente. Todas as soluções foram preparadas com água purificada por osmose reversa ou ultrapura obtida de sistema MilliQ (Millipore). A quitosana e o PHBV foram purificados previamente, conforme detalhado na sequência do texto. Os demais reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

3.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO COENTRO

3.2.1. Hidrodestilação das sementes do *Coriandrum sativum*

A extração do óleo essencial das sementes inteiras da espécie *C. sativum* foi realizada pelo método de hidrodestilação em um destilador do tipo *Clevenger*. Para isso, em um balão de fundo redondo (1000 mL) foram adicionadas as sementes do coentro (160 g) e água purificada (500 mL). O sistema foi aquecido até atingir 100 °C e posteriormente a temperatura foi reduzida até 80 °C, a extração foi realizada durante um período de 6 h. O óleo essencial foi coletado em frascos de vidro, secado sob sulfato de sódio, filtrado e armazenados a -8 °C para posterior análise. O experimento foi realizado em duplicata, com rendimento final de $0,9 \pm 0,1\%$ m V⁻¹.

3.2.2. Microextração em fase sólida dos voláteis das folhas do *Coriandrum sativum*

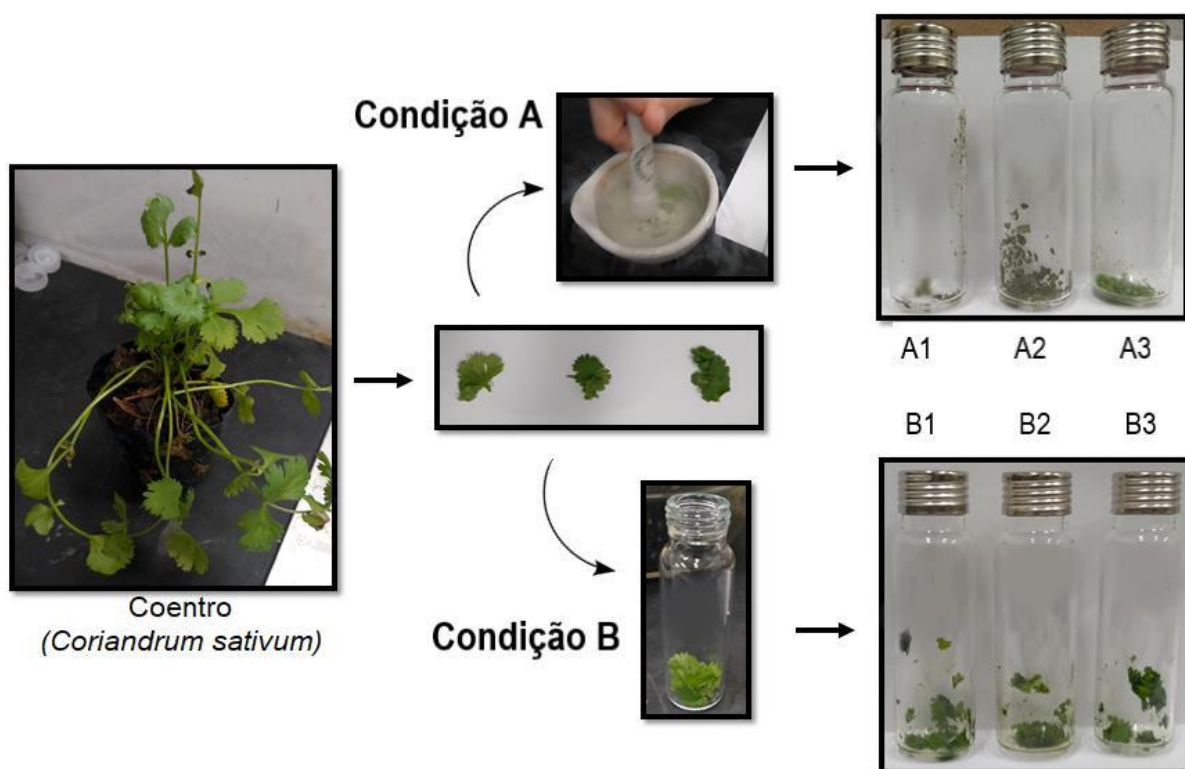
Os compostos orgânicos voláteis produzidos pelas folhas do *C. sativum* foram obtidos empregando a técnica de extração e análise HS-SPME-GC-MS (*Headspace - Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography - Mass Spectrometry*). Para isso, foram coletadas folhas sadias de coentro (jovens e velhas) totalizando 0,1 g, e foram testados dois tipos de preparo de amostra que podem ser observados na FIGURA 11.

Condição A – congelamento em nitrogênio líquido: as folhas previamente pesadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo até ficarem finamente divididas, seguidamente foram transferidas para *vials* de *headspace* (20 mL).

Condição B – maceramento à temperatura ambiente: as folhas previamente pesadas foram transferidas para *vials* de *headspace* (20 mL) e maceradas com ajuda de bastão de vidro.

Após cada tratamento, as amostras foram devidamente lacradas e dispostas no amostrador automático do tipo AOC 5000 Plus (Shimadzu, Japão) para sua posterior análise. Os dois experimentos foram realizados em triplicatas.

FIGURA 11 - ESQUEMA DO PREPARO DAS AMOSTRAS DAS FOLHAS DE COENTRO PARA A SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS



FONTE: O autor (2021)

3.2.3. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Para a identificação dos compostos presentes nas sementes do *C. sativum* foi utilizada a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Após a hidrodestilação, o óleo essencial extraído foi solubilizado em hexano ($20 \mu\text{L mL}^{-1}$) e analisado no cromatógrafo em fase gasosa modelo CG 2010 Plus (Shimadzu, Japão) acoplado ao detector de massas do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040, equipado com coluna capilar RTX-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). O injetor foi ajustado no modo *Split* a 250°C , com uma proporção *Split* de 1:80, usando hélio como gás de arrastre a 1 mL min^{-1} . A programação de temperatura do forno da coluna iniciou a 60°C , com isoterma de 3 min, aquecimento até 275°C na taxa de 3°C min^{-1} , com isoterma final de 10,33 min. O espectrômetro de massas foi operado a 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 250°C .

Para a identificação dos compostos presentes nas folhas do *C. sativum* foi empregada a técnica de extração e a análise HS-SPME-GC-MS. Os compostos orgânicos voláteis das folhas de *C. sativum* foram coletados empregando uma fibra

de *SPME* (Supelco, Itália) de 65 μm de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB). Para isso, os *vials* contendo as amostras foram pré incubados (50 °C, 10 min) e logo foi iniciada a extração expondo a fibra dentro dos *vials* (50 °C, 30 min) e finalmente os compostos foram dessorvidos (3 min) no injetor para a sua análise no mesmo equipamento citado acima. A temperatura do injetor foi programada a 250 °C, no modo *Splitless*, com gás de arrastre hélio a 1 mL min⁻¹. A programação de temperatura do forno da coluna iniciou a 60 °C, com isoterma de 3 min, aquecimento até 240 °C na taxa de 3 °C min⁻¹, e depois aquecida até 280 °C na taxa de 10 °C min⁻¹ com isoterma final de 3 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 280 °C.

O padrão *n*-alcanos (C₇H₁₆–C₃₀H₆₂) (Supelco - Sigma-Aldrich. St. Louis - MO, EUA) foi injetado no CG-EM seguindo as metodologias descritas acima para a análise das sementes e das folhas do coentro. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

3.2.4. Identificação dos compostos orgânicos voláteis

Para a identificação dos compostos das sementes e das folhas do *C. sativum* foi calculado o índice de retenção (IR_{et}) para cada pico (Equação 1) no cromatograma gerado pelo equipamento por meio da normalização dos tempos de retenção (*t_R*) dos constituintes em relação à série homóloga de alcanos C₇H₁₆ – C₃₀H₆₂. Para a determinação da porcentagem relativa de cada composto na amostra, foi realizada a soma de todas as áreas produzidas por cada composto, identificado ou não, e foi adotada como 100%, então a porcentagem relativa individual de cada composto foi calculada relacionando a sua área com a soma de todas as áreas.

$$\text{IR}_{\text{et}} = \left(\frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_{n+1}} - t_{R_n}} \right) \times \text{IR}_n + (\text{IR}_{n+1} - \text{IR}_n) \quad (\text{Eq. 1})$$

em que, IR_{et} é Índice de Retenção do composto X, IR_n é Índice de Retenção do alcano n com *t_R* anterior ao componente X, IR_{n+1} é Índice de Retenção do alcano n+1 com *t_R* posterior ao componente X, *t_{R_x}* é tempo de retenção do composto X, *t_{R_n}* é

tempo de retenção do alceno n com t_R anterior ao componente X, $t_{R_{n+1}}$ é tempo de retenção alceno n+1 com t_R posterior ao componente X.

3.3. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS E DO SURFACTANTE

3.3.1. Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada mediante a adaptação do procedimento descrito por Recillas *et al.* (2009). Inicialmente, o polímero foi disperso em uma solução aquosa de ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($5,1 \text{ mg mL}^{-1}$) e mantido sob agitação mecânica (500 rpm, 12 h) a 25°C . A dispersão foi centrifugada ($10^4 g$, 30 min) a 25°C em uma centrífuga da Sigma 4K15C (Osterode am Harz, Alemanha) e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi precipitado (pH 7) com a adição de uma solução aquosa de NaOH (10 mol L^{-1}), em seguida foi realizada a centrifugação ($10^4 g$, 10 min) a 5°C . O sólido foi lavado com álcool etílico (3x) e com acetona (1x), a cada lavagem foi realizada a centrifugação ($10^4 g$, 10 min) a 5°C . O polímero foi secado em estufa (40°C) e macerado a cada 1 h. Este procedimento foi realizado por três vezes e o rendimento final da quitosana purificada (FIGURA 12) foi de 60%.

FIGURA 12 - IMAGEM DO ASPECTO MACROSCÓPICO DA QUITOSANA APÓS O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO E SECAGEM



FONTE: O autor (2021)

3.3.2. Purificação do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

A purificação do PHBV foi realizada mediante a dispersão do polímero (25 g) em 500 mL de clorofórmio (40 °C, 1 h) sob agitação magnética constante. Após esse período, a dispersão foi mantida sob agitação magnética a 25 °C por 24 h. Posteriormente, foi realizada uma filtração com papel de filtro qualitativo para separar os resíduos ou material insolúvel. Ao sobrenadante foi adicionado *n*-heptano (1000 mL). O precipitado foi filtrado com papel de filtro qualitativo e deixado na capela para evaporação total do solvente residual. Em seguida, o sólido foi macerado a cada 1 h, evitando agregação do material. Por fim, o material foi secado em estufa (40 °C, 24 h) e rendimento final do PHBV purificado (FIGURA 13) foi de 56%.

FIGURA 13 - IMAGEM DO ASPECTO MACROSCÓPICO DO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO) APÓS O PROCESSO DE PURIFICAÇÃO E SECAGEM



FONTE: O autor (2021).

3.3.3. Cromatografia por exclusão de tamanho – Método Absoluto

A cromatografia por exclusão de tamanho foi utilizada para caracterizar os polímeros quitosana e carboximetilcelulose. O sistema (multidetector Viscotek-GPC/SEC) foi composto de um detector de UV-Vis, refratômetro, detector de espalhamento de luz laser (modelo 270 dual detector) com baixo ângulo 7° (LALLS) e alto ângulo 90° (RALLS), uma fonte de luz laser com comprimento de onda (λ) de 632,8 nm e um detector de viscosímetro diferencial (Viscotek, EUA) equipado com uma coluna Shodex-OH Pack SB-806M HQ (USA) a 40 °C com limite de exclusão de 2×10^7 g mol⁻¹. Para a quitosana a fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de

tampão acetato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 4,6) contendo 0,02% (m V⁻¹) de azida de sódio e para a carboximetilcelulose a fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de nitrato de sódio (0,1 mol L⁻¹) contendo 0,02% (m V⁻¹) de azida de sódio.

Dispersões de quitosana (0,5 mg mL⁻¹) e carboximetilcelulose (1,0 mg mL⁻¹) foram preparadas em suas respectivas fases móveis e mantidas em agitação magnética constante por 24 h e antes da injeção foram filtradas com membrana de éster de celulose 0,45 µm (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Foi injetado 100 µL de cada amostra e o fluxo da fase móvel foi de 0,4 mL min⁻¹. Todos os dados foram coletados e analisados usando o *software* OmniSec 4.7 (Viscotek). As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR. A concentração crítica (c*) dos polímeros foi estimada usando a Equação 2 e o coeficiente de Mark-Houwink foi calculado por meio da Equação 3:

$$c^* = \left(\frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi \langle R_g \rangle^3 N_a} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

em que M_w é a massa molar média ponderal, R_g é o raio de giro e N_a é o número de Avogadro.

$$[\eta] = K \times M_v^a \quad (\text{Eq. 3})$$

em que “a” é coeficiente Mark-Houwink-Sakurada, $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, K é a constante do polímero que depende do solvente/temperatura e M_v é a massa molar viscosimétrica.

3.3.4. Cromatografia por exclusão de tamanho – Método Relativo

A cromatografia por exclusão de tamanho foi utilizada para caracterizar o polímero PHBV purificado e não purificado. Foi usado um cromatógrafo a líquido Waters modelo 1515 com amostrador Waters 2707 e detecção por índice de refração Waters 2114. A coluna empregada foi a Styragel HR3, com clorofórmio a 1 mL min⁻¹ como fase móvel. As amostras (5 mg mL⁻¹) foram preparadas em clorofórmio e deixadas sob agitação magnética constante por 12 h. As dispersões foram

cuidadosamente filtradas utilizando uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) hidrofóbico com abertura de poro de 0,45 μm . Os dados foram analisados no *software* Empower 3 no modo GPC. A M_w e a M_n (massa molar média numérica) do PHBV purificado e não purificado foram calibradas usando amostras padrão de poliestireno monodisperso com base em uma curva de calibração de poliestireno de diferentes massas, de 436 a 2890000 g mol^{-1} , perfazendo um total de 19 pontos. Um ajuste polinomial de 5ª ordem foi efetuado, e os valores das constantes de Mark-Houwink utilizados para o poliestireno em clorofórmio foram de $a = 0,734$ e $K = 0,000259 \text{ dL g}^{-1}$, para as amostras empregou-se os mesmos valores de constantes. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório CEPESQ) da UFPR.

3.3.5. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H do PHBV purificado e não purificado (clorofórmio deuterado - CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$), da quitosana (água deuterada/ácido acético deuterado - $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$, 100/2 v v^{-1} , 70 $^\circ\text{C}$), da carboximetilcelulose (D_2O , 70 $^\circ\text{C}$) e do lauril sulfato de sódio (água deuterada/metanol deuterado - $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 50/50 v v^{-1} , 25 $^\circ\text{C}$) foram obtidos utilizando o espectrômetro Avance DRX Bruker 400 MHz, no centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR localizado no Departamento de Bioquímica.

3.3.6. Titulação potenciométrica

Para a análise de titulação potenciométrica, a quitosana purificada (0,251 g) foi dispersa em uma solução aquosa de HCl (50 mL, 0,1 mol L^{-1} , 12 h) a 25 $^\circ\text{C}$. Após, a dispersão foi titulada com solução aquosa de NaOH padronizada (0,1 mol L^{-1}) e a variação do pH foi monitorada sob agitação magnética contínua. O pHmetro MPA 210 (MS TECNOPON) foi utilizado para monitorar a mudança de pH.

O grau de substituição (GS) da carboximetilcelulose foi determinado baseado nos métodos descritos por Eyler, Klug, Diephuis (1947), Toğrul e Arslan, (2003) e Kono e colaboradores (2016). Inicialmente, a carboximetilcelulose (0,200 g) foi dispersa em 2 mL de uma solução aquosa de álcool metílico (80% V V^{-1}). Em seguida, 2 mL de HCl (37%) foram adicionados na dispersão e mantidos sob agitação magnética (900 rpm, 2 h). Na etapa seguinte, a mistura foi centrifugada ($7 \times 10^3 \text{ g}$, 10 min) a 25 $^\circ\text{C}$ e

o precipitado formado foi disperso em água e mantido sob agitação magnética (900 rpm, 1 h). Logo após, uma solução aquosa de NaOH (0,1 mol L⁻¹) foi adicionada sobre essa mistura e mantida em aquecimento (20 min, 100 °C). Por fim, uma gota de solução de fenolftaleína foi adicionada como indicador e a mistura foi titulada com uma solução aquosa de HCl (0,1 mol L⁻¹).

3.3.7. Titulação condutométrica

Os valores de concentração micelar crítica (cmc) e grau de ionização (α) do lauril sulfato de sódio foram determinados a 25 °C por titulação condutométrica utilizando o condutivímetro ANALION C708. As soluções foram preparadas em água ultrapura e solução aquosa de tampão acetato de sódio (0,01 mol L⁻¹, pH 4,6) na concentração de 0,04 mol L⁻¹. A célula de condutividade foi calibrada com solução aquosa de cloreto de potássio 0,01 mol L⁻¹ (1,41 mS cm⁻¹). Os valores de cmc e α , foram obtidos utilizando as Equações 4 e 5, respectivamente

$$cmc = \left(\frac{\text{Coeficiente linear B} - \text{Coeficiente linear A}}{\text{Coeficiente angular A} - \text{Coeficiente angular B}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\alpha = \left(\frac{\text{Coeficiente angular B}}{\text{Coeficiente angular A}} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

3.3.8. Espectroscopia na região do infravermelho

As análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro Vertex 70 (BRUKER, Alemanha) com reflectância total atenuada (ATR). Para cada amostra foram utilizados 16 ou 128 scans, resolução de 4 ou 2 cm⁻¹ e faixa do número de onda de 400–4000 cm⁻¹. As análises foram realizadas no Departamento de Farmácia (Laboratório CEB) da UFPR.

3.3.9. Polarimetria

As análises de polarimétricas foram realizadas utilizando um polarímetro modelo P-2000 da Jasco. As amostras de (±)-linalol e (-)-linalol foram preparadas nas

concentrações de 5% (m V⁻¹) em álcool etílico 99%, analisadas a 20 °C e utilizando a linha de emissão em 589 nm de uma lâmpada de sódio. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Central Analítica) da UFPR.

3.4. FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS PELA TÉCNICA *Layer-by-Layer*

3.4.1. Nanoemulsão seguida do revestimento com quitosana

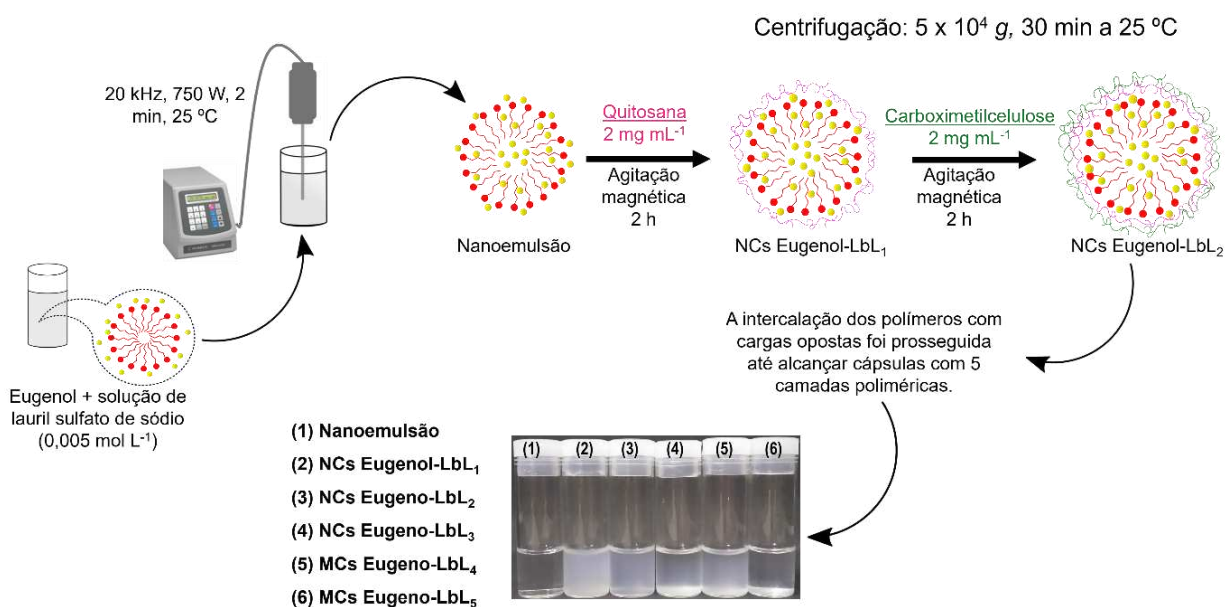
O processo de desenvolvimento das nanocápsulas iniciou-se com a formação da nanoemulsão (solução de lauril sulfato de sódio + eugenol) e posterior adição de dispersões de quitosana. Três concentrações de quitosana foram testadas, 2, 6 e 10 mg mL⁻¹. O dispersante utilizado foi uma solução aquosa de tampão acetato de sódio a 0,01 mol L⁻¹ e pH 4,6 e a técnica de análise de potencial zeta (potencial ζ) foi utilizada para monitorar a inversão de potencial de superfície das amostras. Por meio do equipamento Particle Charge Mapping Stabino (Alemanha) e utilizando a célula de medição de 10 mL acoplada a um pistão de 400 μ m, foram realizadas as adições das dispersões de quitosana com diferentes concentrações sobre a nanoemulsão (100 μ L, 100 s). Após a definição da concentração de quitosana mais adequada, deu-se início a formação das nanocápsulas com diversas camadas poliméricas.

3.4.2. Formulação 1- Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol

A nanoemulsão (Eugenol-LSS) foi preparada por adição do eugenol em 4 mL de uma solução de lauril sulfato de sódio (LSS) acima da cmc (0,005 mol L⁻¹). Essa mistura foi sonicada continuamente (Ultrasonics Sonicator, EUA) (25%, 20 kHz, 750 W, 2 min) a 25 °C e após, mantida sob agitação magnética a 900 rpm (Magnital Agitator MAG15, Marte Científica, Brasil) por 5 min. Em seguida, a dispersão de quitosana (2 mg mL⁻¹) foi adicionada sobre a nanoemulsão Eugenol-LSS dando origem as nanocápsulas (NCs) com a primeira camada de polímero, nomeada de NCs Eugenol-LbL₁. Para obter a segunda camada, uma dispersão de carboximetilcelulose (2 mg mL⁻¹) foi adicionada sobre as NCs Eugenol-LbL₁, originando as NCs Eugenol-

LbL₂. A deposição das camadas de polímeros com quitosana e carboximetilcelulose foi seguida até a obtenção de cápsulas com cinco camadas poliméricas, chamadas de: três camadas: NCs Eugenol-LbL₃; quatro camadas: microcápsulas (MCs) MCs Eugenol-LbL₄ e cinco camadas: MCs Eugenol-LbL₅. Após cada deposição de polímero, as cápsulas foram centrifugadas (5×10^4 g, 30 min) a 25 °C, lavadas com água ultrapura e mantidas sob agitação magnética contínua (900 rpm, 2 h) a 25 °C. Todas as amostras foram preparadas em solução aquosa de tampão acetato de sódio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,6). O esquema de formação das nanocápsulas e microcápsulas utilizando os biopolímeros quitosana e carboximetilcelulose obtidos pela técnica LbL pode ser observado na FIGURA 14.

FIGURA 14 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE PELO MÉTODO LbL



FONTE: O autor (2021)

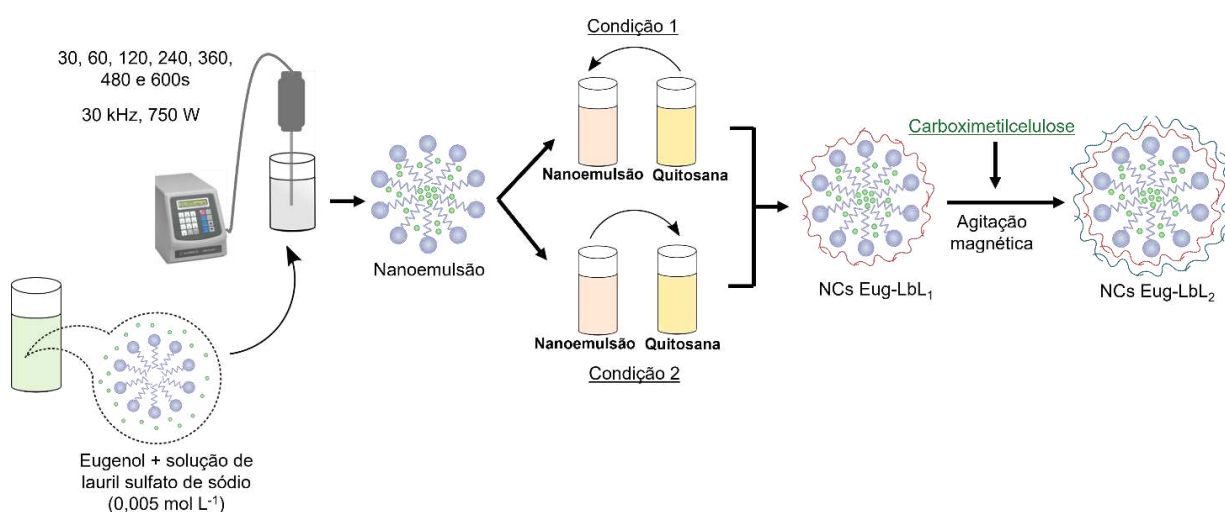
3.4.3. Formulação 2 – Estudo da formação do *template* aniônico seguida da formação das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol

A nanoemulsão (*template* aniônico) de eugenol foi obtida a partir da adição de 35 mg de eugenol em 20 mL de lauril sulfato de sódio acima da cmc ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$). Essa mistura foi sonicada a 30%, 20 kHz, 750 W e 0 °C. Então, a variação do tempo

de sonicação foi realizada de 30, 120, 240, 360, 480 a 600 s. No final do processo de sonicação, a nanoemulsão foi deixada sob agitação magnética contínua a 900 rpm por 15 min.

A técnica LbL foi utilizada para a autoassociação de camadas de polieletrólitos. As dispersões poliméricas de quitosana (2 mg mL^{-1}) e carboximetilcelulose (2 mg mL^{-1}) foram utilizadas como polieletrólitos. As nanoemulsões foram preparadas em solução aquosa de tampão acetato de sódio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,6). A etapa de autoassociação foi realizada em duas situações diferentes: condição 1 (C1), a dispersão do polímero foi adicionada à nanoemulsão; condição 2 (C2), a nanoemulsão foi adicionada à dispersão do polímero. A partir das nanoemulsões, as nanocápsulas foram formadas por deposição alternada dos polieletrólitos: catiônicos (NCs Eug-LbL₁) e aniônicos (NCs Eug-LbL₂). Após cada deposição de polímero, as cápsulas foram centrifugadas ($5 \times 10^4 \text{ g}$, 30 min) a 25°C , lavadas com água purificada e mantidas sob agitação magnética contínua a 900 rpm, 25°C por 1 h. Na FIGURA 15 pode ser observado o esquema de obtenção das nanocápsulas.

FIGURA 15 - ESQUEMA DA FORMULAÇÃO 2 DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE PELO MÉTODO LbL



FONTE: O autor (2021)

3.4.4. Formulações 3 e 4- Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol ou 1-decanol

A Formulação 3 é referente ao composto linalol e a Formulação 4 ao 1-decanol. As nanoemulsões de linalol ou 1-decanol foram obtidas a partir da adição do composto em uma solução de lauril sulfato de sódio acima da cmc ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$). Essa mistura foi sonicada a 30%, 20 kHz, 750 W, por 10 min a 0°C . Após a sonicação, a nanoemulsão foi deixada sob agitação magnética contínua a 900 rpm por 15 min. Em seguida, a nanoemulsão contendo o composto foi vertida sobre a dispersão de quitosana $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, originando as nanocápsulas (NCs Lin-LbL₁ ou 1Dec-LbL₁). Após 1 h, a dispersão de carboximetilcelulose ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi vertida sobre as NCs Lin-LbL₁ ou 1Dec-LbL₁, dando origem às nanocápsulas (NCs Lin-LbL₂ ou 1Dec-LbL₂). Após cada deposição de polímero, as nanocápsulas foram centrifugadas ($5 \times 10^4 g$, 30 min) a 25°C , lavadas com água purificada e mantidas sob agitação magnética contínua a 900 rpm, 25°C por 1 h. O esquema de obtenção das nanocápsulas é similar ao apresentado na FIGURA 15.

3.5. FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS PELA TÉCNICA DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL

3.5.1. Formulação 5 – Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol

3.5.1.1. Delineamento experimental

Um planejamento fatorial 2^3 com ponto central foi aplicado para investigar a influência das variáveis independentes sobre as propriedades das nanocápsulas contendo eugenol, a fim de identificar as condições ideais para produzi-las. As variáveis independentes escolhidas foram: concentração de PHBV, velocidade de homogeneização e massa de eugenol. As variáveis usadas no ponto central foram escolhidas baseadas em experimentos preliminares. Outros componentes usados nas formulações foram mantidos constantes. Os três níveis dos fatores investigados foram codificados como -1, 0 e +1 para gerar oito experimentos com três repetições do ponto central (TABELA 1). As variáveis respostas incluíram a eficiência de incorporação do

eugenol nas nanocápsulas, o diâmetro hidrodinâmico aparente (D_{happ} / nm) e índice de polidispersão (IPd) das nanocápsulas.

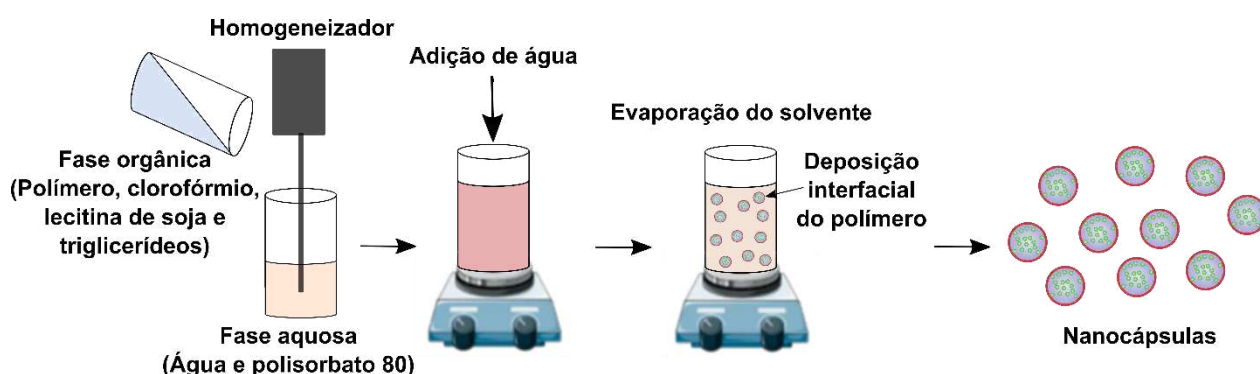
TABELA 1 - NÍVEIS E VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL

	Variável independente	Nível		
		-1	0	+1
X1	Concentração do PHBV (mg L ⁻¹)	2	3	4
X2	Velocidade de homogeneização (rpm)	8000	11500	15000
X3	Massa de eugenol (mg)	5	20	35

FONTE: O autor (2021)

As nanocápsulas de PHBV carregadas com eugenol foram preparadas usando o método de deposição interfacial previamente descrito por Fessi *et al.* (1989), com algumas adaptações. Inicialmente foi preparada a fase orgânica, o PHBV (20 mg), ácido caprílico (67 mg), lecitina de soja (13 mg) e eugenol (5, 20 ou 35 mg) foram dispersos em clorofórmio (10 mL). Em paralelo, foi preparada a fase aquosa contendo água purificada (10 mL) e polisorbato 80 (20 mg). Em seguida, a fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa e utilizado uma homogeneização de alta velocidade (15000 rpm) (Ultra-Turrax® Ika-Werke, Alemanha) por 5 min. Logo após, a dispersão foi deixada sob agitação magnética contínua por 30 min e adicionado 33 mL de água purificada. A mistura foi mantida sob agitação magnética até total evaporação do clorofórmio (25 °C, 24 h). A formação das nanocápsulas pode ser observada no esquema presente na FIGURA 16.

FIGURA 16 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE PHBV PELO MÉTODO DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL



FONTE: O autor (2021)

3.5.2. Formulações 6 e 7- Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo linalol

A Formulação 6 refere-se ao linalol e a Formulação 7 é em relação ao composto 1-decanol. As nanocápsulas de PHBV carregadas com linalol ou 1-decanol foram preparadas usando o método de deposição interfacial previamente descrito por Fessi *et al.* (1989), com algumas adaptações. Inicialmente, foi preparada a fase orgânica, o PHBV (20 mg), ácido caprílico (67 mg), lecitina de soja (13 mg) e linalol ou 1-decanol (35 mg) foram dispersos em clorofórmio (10 mL). Em paralelo preparou-se a fase aquosa contendo água purificada (10 mL) e polisorbato 80 (20 mg). Em seguida, a fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa e utilizado uma homogeneização de alta velocidade (15000 rpm) (Ultra-Turrax® Ika-Werke, Alemanha) por 5 min. Logo após, a dispersão foi deixada sob agitação magnética contínua por 30 min e adicionado 33 mL de água purificada. A mistura foi mantida sob agitação magnética até total evaporação do clorofórmio (25 °C, 24 h). O esquema de formação das nanocápsulas foi seguido conforme demonstrado na FIGURA 16.

3.6. TÉCNICA DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

3.6.1. Microscopia confocal de varredura a laser

A análise de microscopia confocal de varredura a laser foi realizada em um microscópio Nikon Ti A1R MP (Tokio, Japan) com comprimento de onda de excitação de 561 nm e filtro de emissão de 595 nm para a rodamina. As imagens foram obtidas com lentes objetivas de aumento de 20x, 40x e 60x e abertura numérica de 0,75 e 1,4 no *software* NIS-Elements Analysis 4.20 e processadas no Fiji (ImageJ). As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Biológicas (Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal) da UFPR.

3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS

3.7.1. Potencial zeta (ζ)

As análises de potencial ζ foram realizadas no aparelho Particle Charge Mapping Stabino (Alemanha). As amostras foram diluídas em água purificada (1:50 v v⁻¹) e analisadas por 100 s a 20 °C. Foram utilizadas um células de medição de 1 mL ou de 10 mL acoplada a um pistão de 400 μ m.

As análises de potencial ζ também foram realizadas para as bactérias e fungos, assim como para as interações entre os micro-organismos e as nanocápsulas. Inicialmente, 1 mL de uma suspensão de micro-organismo (dispersos no meio caldo específico para cada micro-organismo) foi adicionado em 1 mL de nanocápsulas, cuidadosamente homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 min. Em seguida, em uma célula de medição de 1 mL acoplada a um pistão de 400 μ m foram realizadas as análises por 5 min a 20 °C.

As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR.

3.7.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (TESCAN VEGA3 LMU, Brno, República Checa) e a espectroscopia de energia dispersiva (AZ Tech software, Advanced) foram usadas para caracterizar o diâmetro, forma e a composição das nano e microcápsulas. As amostras foram colocadas em um suporte de metal contendo uma fita dupla face de cobre e, após a análise de espectroscopia de energia dispersiva, foram metalizadas com uma camada de ouro. As imagens foram obtidas com um potencial de aceleração de 15 kV sob baixo vácuo. A aquisição das imagens foi realizada pelo *software* Vega, versão TC (Tescan, Brno, República Checa) com um detector de elétrons secundário. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR.

3.7.3. Espalhamento de luz dinâmico

O diâmetro hidrodinâmico aparente das nanocápsulas e microcápsulas foi determinado usando o espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering - DLS*). As amostras foram diluídas em água purificada 1:50 (v v⁻¹) e injetadas no aparelho NANO DLS Particle Size Analyzer da BrookHaven Instruments (Holtsville, New York, EUA) operando a 90° e comprimento de onda de 632,8 nm, fornecida por um laser He-Ne de estado sólido de 15 mW. A água purificada e as amostras foram filtradas em membrana de éster de celulose com abertura de poro de 0,22 µm e 3 µm, respectivamente. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR.

3.7.4. Espectrofotometria na região do UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em uma faixa de comprimento de onda de 200–350 nm no espectrômetro UV-2401PC (SHIMADZU, Japão). As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

3.7.5. Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas (TGA) para o eugenol (6,1 mg), mistura de quitosana e carboximetilcelulose (5,2 mg), NCs Eug-LbL₁ (4,9 mg) e NCs Eug-LbL₂ (4,6 mg) foram realizadas utilizando cadinhos de alumina (0,065 mL) com um analisador da Netzsch (STA 449 F3 series EP), seguindo uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e uma rampa de 25 para 600 °C sob atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹). A mistura dos polímeros e as nanocápsulas foram previamente liofilizadas a -50 °C. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

Para o linalol (5,1 mg), 1-decanol (6,1 mg), PHBV (5,7 mg), NCs Lin-PHBV (5,4 mg), NCs 1Dec-PHBV (5,4 mg), NCs Eug-PHBV (5,8 mg), NCs Lin-LbL₁ (6,4 mg), NCs Lin-LbL₂ (5,2 mg), NCs 1Dec-LbL₁ (5,7 mg), NCs 1Dec-LbL₂ (5,7 mg), NCs LbL₁ (6,5 mg) e NCs LbL₂ (5,3 mg), as análises de TGA foram realizadas utilizando o

sistema PerkinElmer (TGA 4000) e cadinhos de alumina (0,065 mL). A taxa de aquecimento foi de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com uma rampa de 35 a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio (10 mL min^{-1}). O *software* utilizado foi Pyris, versão 13.3.10014 da PerkinElmer. As nanocápsulas foram previamente liofilizadas a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas no Departamento de Física e Química (Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides) da UNESP em Araraquara.

3.7.6. Microbalança de cristal de quartzo e Microscopia de força atômica

Para a formação das nanocápsulas de linalol e 1-decanol, três concentrações diferentes de quitosana e de carboximetilcelulose foram testadas ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$, $1,0\text{ mg mL}^{-1}$ e $2,0\text{ mg mL}^{-1}$). Com o auxílio da microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação de energia (QCM-D) (Biolin Scientific, Q-Sense E4 – Reino Unido) foi monitorada a interação entre os dois polímeros nas diferentes concentrações. Após o processo de limpeza dos cristais piezoelétricos (imersão em uma solução de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico 1:3 (v v⁻¹) por 5 min, lavagem com água ultrapura (3x, 5 min) e etanol (1x, 5 min)), eles foram deixados em contato com uma solução aquosa de L-cisteína 1% (m m^{-1}) por 24 h, lavados com água purificada e acetona, secados em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Em seguida, deixados em contato com uma solução aquosa de glutaraldeído 5% (m m^{-1}) por 30 min, lavados com água purificada e secados em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Após esse processo, as dispersões de quitosana nas concentrações de $0,5\text{ mg mL}^{-1}$, $1,0\text{ mg mL}^{-1}$ ou $2,0\text{ mg mL}^{-1}$ foram gotejadas sobre os cristais de quartzo e secados a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Na etapa seguinte, os cristais de quartzo modificados com as dispersões de quitosana foram acomodados nos módulos do equipamento, ajustado o fluxo da bomba para $80\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ e a temperatura para $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A análise seguiu da seguinte maneira: inicialmente um fluxo de água purificada por 1 h, seguida das dispersões de carboximetilcelulose ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$, $1,0\text{ mg mL}^{-1}$ ou $2,0\text{ mg mL}^{-1}$) por 1 h, água purificada por 1 h e, por fim, um fluxo das dispersões de quitosana ($0,5\text{ mg mL}^{-1}$, $1,0\text{ mg mL}^{-1}$ ou $2,0\text{ mg mL}^{-1}$) por 1 h. Por meio da equação de Sauerbrey (Equação 6) pode ser obtida a adsorção de filmes finos rígidos na superfície do cristal piezoelétrico, a qual correlaciona a mudança de frequência de ressonância (Δf) do quartzo com a sua mudança de massa (Δm) na superfície.

$$-\Delta f = \left(\frac{2f_0^2}{A (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \right) \times \Delta m = C \times \frac{\Delta m}{v} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde f_0 é a frequência inicial do QCM (9×10^6 Hz), A é a área do eletrodo ($0,159 \text{ cm}^2$), μ_c e ρ_c são os módulos de cisalhamento e densidade do cristal de quartzo, respectivamente, v é o número do harmônico, C é o coeficiente de sensibilidade teórica do QCM ($17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cristais de 5 MHz).

Para confirmar a possível modificação dos cristais, eles foram secos em estufa (40°C) após cada etapa e submetidos a análise de microscopia de força atômica e ângulo de contato. Para as imagens de microscopia de força atômica (MFA), as amostras das dispersões de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para ambos os polímeros, foram depositadas no cristal de quartzo e secadas em estufa a 40°C por 24 h antes da análise. As imagens foram obtidas por meio do equipamento Agilent Scanning Probe Microscope, modelo 5500, utilizando cantilever NSC15-AIBS (Mikromasch®), com constante de força de 40 N m^{-1} e frequência de ressonância de 150 KHz, no modo de contato intermitente (*tapping*). As imagens foram obtidas utilizando o *software* Picoview 14.4 e o pós-tratamento de dados foi realizado com o *software* Gwyddion 2.52. Ambas as análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR.

3.8. EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO, LIBERAÇÃO *in vitro*, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE

3.8.1. Eficiência de incorporação

3.8.1.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose para o eugenol

Formulações 1 e 2

A eficiência de incorporação (EI%) dos ativos nas nanocápsulas após cada deposição de camada polimérica foi determinada pela adaptação do método descrito por Natrajan *et al.* (2015). As cápsulas (2 mL) foram centrifugadas ($4 \times 10^3 \text{ g}$, 15 min) a 5°C . O sobrenadante foi removido e clorofórmio (Formulação 1) ou etanol (Formulação 2) (2 mL) foi adicionado sobre o precipitado, misturado e centrifugado (4

x 10³ g, 20 min) a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e a absorbância foi medida no comprimento de onda específico (281 nm) por espectroscopia na região do UV–Vis. A partir da curva de calibração, a eficiência de incorporação (EI%) foi estimada seguindo a Equação 7:

$$EI(\%) = \left(\frac{\text{Ativo}_{\text{Encapsulado}}}{\text{Ativo}_{\text{Total}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

em que $\text{Ativo}_{\text{Total}}$ é a massa de ativo adicionada no experimento e $\text{Ativo}_{\text{Encapsulado}}$ é a massa do ativo nas nanocápsulas ou microcápsulas.

3.8.1.2. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o eugenol

Formulação 5

A eficiência de incorporação para o eugenol encapsulado em PHBV foi determinada seguindo o método descrito por (WORANUCH; YOKSAN, 2013) com algumas adaptações. As amostras (3 mL) foram coletadas e secadas em estufa a 40 °C. Em seguida, uma solução aquosa de HCl (1 mol L⁻¹, 2 mL) foi adicionada sobre a amostra seca e aquecida até 95 °C por 30 min. Logo após, foram adicionados 2 mL de etanol sobre a mistura e centrifugado (6,7 x 10³ g, 3 h) a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e a absorbância foi analisada em uma faixa de comprimento de onda de 230 a 350 nm por espectroscopia na região do UV–Vis. O mesmo procedimento foi realizado para as nanocápsulas sem a presença do eugenol e realizada a subtração das absorbâncias. A partir da curva de calibração, a eficiência de incorporação foi estimada seguindo a Equação 7, p. 72.

3.8.1.3. Nanocápsulas de quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o linalol e 1-decanol

Formulações 3, 4, 6 e 7

Para as nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose do linalol e 1-decanol: as nanocápsulas (2 mL) foram centrifugadas (4 x 10³ g, 20 min) a 20 °C. O sobrenadante foi removido e metanol (2 mL) foi adicionado sobre o precipitado,

misturado e centrifugado (4×10^3 g, 20 min) a 20 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE com abertura de poro de 0,22 μ m para posterior análise.

Para as nanocápsulas de PHBV do linalol e 1-decanol: as nanocápsulas (2 mL) foram centrifugadas por ultracentrifugação em tubo Amicon® Ultra-15 com abertura de poro de 3 kDa (Sigma-Aldrich, Alemanha) (3×10^3 g, 15 min) a 20 °C. O sobrenadante foi removido e o concentrado foi transferido para um tubo plástico de 2 mL e então adicionado metanol (1 mL), misturado e centrifugado ($6,7 \times 10^3$ g, 3 h) a 20 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE com abertura de poro de 0,22 μ m para posterior análise.

A eficiência de incorporação do linalol ou 1-decanol nas nanocápsulas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com os detectores por ultravioleta visível (UV-Vis) e índice de refração (IR), respectivamente, em um Cromatógrafo Shimadzu®, modelo LC-20 AD com injetor manual. Para as análises foi utilizando o cromatógrafo Prominence (Shimadzu) com uma coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, partículas de 5 μ m). As condições cromatográficas aplicadas foram determinadas previamente. Foi utilizada a eluição em modo isocrático. Para o linalol: fase móvel acetonitrila e água ultrapura (60/40% v v⁻¹), fluxo de 1 mL min⁻¹ a 30 °C, tempo de corrida de 15 min e absorbância em 210 nm. Para o 1-decanol: fase móvel metanol e água ultrapura (80/40 v v⁻¹), fluxo de 0,6 mL min⁻¹ a 30 °C e tempo de corrida de 15 min. As duas fases móveis foram filtradas em membrana de PTFE com abertura de poro de 0,45 μ m e em seguida degaseificada por 20 min. A partir da curva de calibração, a eficiência de incorporação foi estimada seguindo a Equação 7, p. 72.

3.8.2. Perfil de liberação *in vitro*

3.8.2.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose para o eugenol

Formulações 1 e 2

A taxa de liberação cumulativa do eugenol foi analisada por adaptação do método de Sotelo-Boyás e colaboradores (2017). As amostras (20 mL) previamente centrifugadas (4×10^3 g, 30 min, 25 °C) e dispersas em água ultrapura foram adicionados em uma membrana de diálise de éster de celulose (sistema doador) com diâmetro de poro de 12 kg mol⁻¹ (D0530-100FT, Sigma-Aldrich) e adicionadas no sistema receptor contendo água (60 mL). O experimento foi realizado a 25 °C e

agitação magnética (500 rpm, 96 h). A cada determinado intervalo de tempo, uma alíquota (2 mL) do meio receptor foi coletada e analisada no espectrofotômetro na região do UV-Vis (281 nm). O meio receptor foi repostado com igual volume de água. Para analisar a influência do pH do meio foram testados dois valores de pH. Nanocápsulas de Eugenol-LbL₁ e Eugenol-LbL₂ foram dispersas em meio ácido e básico (pH 3,8 e pH 8,8, ajustados com gotas de soluções aquosas de HCl e NaOH (0,1 mol L⁻¹), respectivamente) e as análises foram realizadas como descrito acima. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.8.2.2. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o eugenol

Formulação 5

Para o eugenol encapsulados em PHBV, inicialmente as amostras foram centrifugadas (3 x 10³ g, 40 min, 25 °C) por ultrafiltração em tubos Amicon® Ultra-15 com abertura de poro de 3 kg mol⁻¹. Logo em seguida, as amostras centrifugadas (10 mL) foram acondicionadas na parte superior do tubo Amicon® Ultra-15 (sistema doador) e 25 mL de tampão fosfato salino (0,01 mol L⁻¹, pH 7,2) contendo 0,5% de polisorbato 80 (v v⁻¹) foi adicionado na parte inferior do tubo (sistema receptor). O experimento foi realizado a 25 °C e agitação magnética (900 rpm, 72 h). A cada intervalo de tempo as amostras foram centrifugadas (3 x 10³ g, 25 °C) e alíquotas de 2 mL do meio receptor foram coletadas e analisadas no espectrofotômetro na região do UV-Vis em uma faixa de comprimento de onda de 230 a 350. O meio receptor para todos os experimentos foi repostado com igual volume de tampão fosfato salino. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.8.2.3. Nanoemulsões de lauril sulfato de sódio e nanocápsulas de quitosana, carboximetilcelulose e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para o linalol e 1-decanol

Formulações 3, 4, 6 e 7

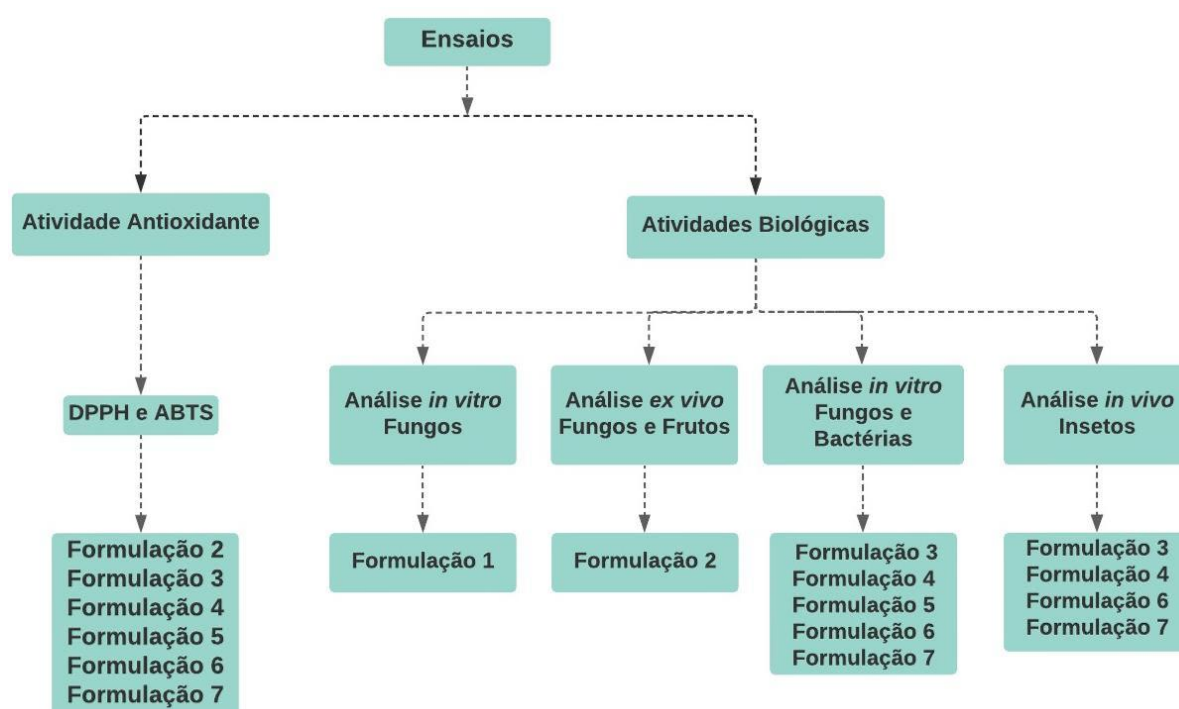
Os perfis de liberação do linalol e do 1-decanol foram analisados de forma semelhante ao utilizando para o eugenol das formulações 1 e 2. As amostras (15 mL), previamente centrifugadas (4 x 10³ g, 30 min, 25 °C – Formulações 3 e 4) ou

centrifugadas por ultrafiltração (3×10^3 g, 10 min, 25 °C – Formulações 6 e 7) e dispersas em água ultrapura contendo polisorbato 80 (1,5% m V⁻¹), foram adicionadas em uma membrana de diálise de éster de celulose (sistema doador) com diâmetro de poro de 12 kg mol^{-1} e adicionadas no sistema receptor contendo 30 mL de água ultrapura e polisorbato 80 (1,5% m V⁻¹). O experimento foi realizado a 25 °C e agitação magnética (900 rpm, 96 h). Para o linalol, alíquotas de 1 mL do meio receptor foram coletadas e analisada por CLAE/UV-Vis no comprimento de onda de 210 nm. Para o 1-decanol, alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio receptor e quantificadas por CG-EM. Para que a quantificação por CG-EM fosse possível, essas alíquotas foram submetidas previamente a uma microextração líquido-líquido, seguindo o seguinte protocolo: foi utilizado 3 microextrações com 300 µL de clorofórmio cada. A cada microextração as amostras foram agitadas em vortex por 1 min a 2400 rpm e na última microextração, além de agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min (4×10^3 g). Em seguida, as amostras foram permeadas por colunas contendo sulfato de sódio anidro e ajustado o volume da amostra para 1 mL, as colunas de sulfato de sódio anidro foram previamente ambientadas com clorofórmio. Após seguir esse protocolo para todas as alíquotas, o 1-decanol foi quantificado por meio de um cromatógrafo em fase gasosa acoplado à espectrômetro de massas Shimadzu® CG-EM QP2010 Plus, equipado com coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo *Split* (1:20) a 250 °C, interfase e fonte de íons a 300 °C. A janela de massas foi ajustada para as análises na faixa entre 40-350 m/z, utilizando hélio como gás de arrastre (1 mL min⁻¹). Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250 °C, pressão da coluna de 93,1 KPa, iniciando-se com temperatura de 60 °C por 5 min elevando-se para 110 °C a uma razão de 10 °C min⁻¹ e depois de se manter por 8 min, elevando-se novamente até 250 °C a uma razão de 30 °C min⁻¹, com tempo total de corrida de 20 min. Em relação a coleta das alíquotas, o meio receptor foi repostado com igual volume de água ultrapura contendo polisorbato 80 (1,5% m V⁻¹). Para o linalol os experimentos foram realizados em triplicatas e para o 1-decanol em duplicata.

As análises utilizando UV-Vis foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR. As análises utilizando CLAE foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR. As análises utilizando CG-EM foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório LECOSIN) da UFPR.

Após as caracterizações das nano ou microcápsulas, foram realizados ensaios de atividade antioxidante, atividades antimicrobianas e de repelência à insetos para as amostras. Na FIGURA 17 pode ser observado um fluxograma simplificado contendo os ensaios e quais amostras foram utilizadas em cada ensaio.

FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA REFERENTE AOS ENSAIOS QUE CADA FORMULAÇÃO FOI SUBMETIDA



FONTE: O autor (2021)

3.8.3. Determinação da atividade antioxidante

Formulações 2, 3, 4, 5, 6, e 7

Para os ensaios com DPPH[•] foi seguido a metodologia descrita por Thaipong e colaboradores (2006) com algumas modificações. O DPPH[•] (24 mg) foi solubilizado em 100 mL de etanol e estocado em geladeira ao abrigo da luz. A solução estoque foi diluída em etanol na proporção 1:4,5 (V V⁻¹) para a absorbância de 1,04 ± 0,03 unidades a 515 nm em um espectrofotômetro na região do UV-Vis. Novas soluções de DPPH[•] foram preparadas a cada experimento. As amostras foram colocadas para reagir com o DPPH[•] e analisados os tempos: 0, 10, 20, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h. Durante a análise, as amostras permaneceram ao abrigo da luz. Foi realizado a

varredura de 600 a 450 nm, com absorção máxima em 515 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) seguindo a Equação 8.

$$\% AAO = \frac{(A_0 - A_a)}{A_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

sendo, A_0 o valor da absorbância da solução de DPPH[•] e A_a da solução de DPPH[•] na presença das amostras.

Para os ensaios com ABTS^{•+} foi seguido a metodologia descrita por Thaipong e colaboradores (2006) com algumas modificações. Primeiramente, o ABTS^{•+} (7,4 mmol L⁻¹) e o persulfato de potássio (2,6 mmol L⁻¹) foram solubilizados separadamente em 10 mL de água ultrapura. Em seguida, essas soluções aquosas foram misturadas e deixadas reagindo por 12 h em geladeira ao abrigo da luz. A solução estoque foi diluída em água ultrapura na proporção 1:8 (V V⁻¹) para a absorbância de $1,00 \pm 0,03$ unidades a 734 nm em um espectrofotômetro na região do UV-Vis. Novas soluções de ABTS^{•+} foram preparadas a cada experimento. As amostras foram colocadas para reagir com o ABTS^{•+} e analisados após 2 h. Durante a análise, as amostras permaneceram ao abrigo da luz. Foi realizado a varredura de 800 a 650 nm, com absorção máxima em 734 nm. A curva analítica foi linear entre 1,56 a 200 µmol L⁻¹ de Trolox. Os dados foram expressos em equivalente de Trolox mmol L⁻¹ (ET/g).

Nas duas análises foram utilizados como controle negativo a água ultrapura e como controle positivo uma solução de vitamina C (176,1 µg mL⁻¹). As análises utilizando o espectrofotômetro na região do UV-Vis foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

3.8.4. Propriedades de superfície

Formulação 2

O revestimento das nectarinas foi realizado com a nanocápsulas na ausência e na presença de eugenol. As nectarinas sem revestimentos foram utilizadas como controle. As nectarinas foram colocadas em contato com as nanocápsulas ou a água purificada por 30 s e deixadas secar por 24 h. Após a secagem, a pele da nectarina

foi cortada e a análise do ângulo de contato foi realizada em duplicado com seis gotas por amostra.

3.8.4.1. Ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato foram realizadas com três líquidos de diferentes polaridades: água, formamida e diodometano e medidas a 20 °C. O ângulo de contato na superfície da nectarina foi medido pelo método da gota sêssil, foram gotejados 5 µL de cada líquido nas amostras e o tempo de equilíbrio de 10 s foi adotado como padrão para as medidas. As análises foram realizadas em um tensiômetro DataPhysics Instruments GmbH Contact Angle System OCA15+ (Alemanha) com auxílio de uma seringa Hamilton de 500 µL e agulha com diâmetro externo de 1,65 mm e comprimento de 38,1 mm. Com auxílio da câmera presente no tensiômetro, foram capturadas as imagens das gotas formadas e utilizando o *software* SCA20 foi traçado manualmente o perfil da gota utilizando o modelo de elipsoide e, portanto, obtido os ângulo de contato esquerdo e direito de cada gota. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório BioPol) da UFPR.

3.9. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

3.9.1. Ensaios de atividade antimicrobiana

Formulação 1

Os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp foram previamente cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por 7 dias a 28 °C e a levedura *Candida albicans* por 24 h a 35 °C.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada usando o método de microdiluição com uma placa de 96 poços de acordo com metodologias padrões Clinical and Laboratory Standards Institute M27 para leveduras e M38 para fungos filamentosos (2017). As amostras foram diluídas em meio caldo *Sabouraud*. Em seguida, 100 µL de inóculo fúngico ($5,0 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ para os fungos filamentosos e levedura, respectivamente) foram adicionados em todos os poços (exceto no poço de controle estéril). A susceptibilidade dos fungos às cápsulas foi testada nas concentrações de 0,9 até 400,0 µg mL⁻¹, para a quitosana e

carboximetilcelulose de 7,8 a 1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o lauril sulfato de sódio de 5,6 a 722,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As microplacas foram incubadas a 28 °C para os fungos filamentosos e 35 °C para as leveduras, ambos por 48 h. Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração de cada amostra que inibiu 100% do crescimento microbiano. Água destilada autoclavada foi utilizada como controle negativo e o padrão analítico de cicloheximida como controle positivo (50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todas as análises foram realizadas em duplicata. As análises foram realizadas no Departamento de Química e Biologia (Laboratório Biotecnologia) da UTFPR.

3.9.2. Ensaios *ex vivo* para o controle de *Monilinia fructicola*

Formulação 2

O fungo *Monilinia fructicola*, isolado PpMfSP15/575, pertence à coleção LEMID-UFPR. A suspensão de conídios foi preparada coletando os esporos na superfície dos frutos pré-inoculados e dispersando-os em solução aquosa estéril de polisorbato 20 (0,5% V V⁻¹).

As nectarinas (*Prunus persica* var. *nucipersica*) do cultivar Sungold (Santa Catarina - Brasil) foram utilizadas no experimento. Esses frutos foram previamente higienizados por imersão (1 min) com etanol (70,0% V V⁻¹), hipoclorito de sódio (1,0% V V⁻¹) e água destilada (3 x) e, em seguida, deixados secar a 25 °C (FIGURA 18A).

FIGURA 18 - (A) FRUTOS NECTARINAS SANITIZADOS, (B) LOCAL DO EXPERIMENTO COM OS FRUTOS NECTARINAS EM CÂMARA ÚMIDA



FONTE: O autor (2021)

Os frutos nectarinas foram tratados com água estéril como controle negativo, solução aquosa de eugenol utilizando dimetilsulfóxido e Adivex® como co-solventes (formulação de controle), nanocápsulas na ausência de eugenol (LbL₁), nanocápsulas na presença de eugenol (Eugenol-LbL₁₋₂) e o fungicida iprodiona (Rovral SC® 500 g L⁻¹ Basf, França) como controle positivo. As nectarinas foram mergulhadas em cada tratamento por 30 s e secas por 24 h. Em seguida, cada nectarina foi inoculada com 40 µL da suspensão de conídios de *Monilinia fructicola* (10⁵ conídios mL⁻¹) e as amostras foram colocadas em câmara úmida (FIGURA 18B). Sete repetições foram realizadas para cada tratamento e as avaliações dos sintomas foram realizadas a cada 24 h durante 7 dias. O experimento foi conduzido duas vezes em um delineamento experimental randomizado. Estes experimentos foram realizados no Setor de Ciências Agrárias (Laboratório LEMID) da UFPR.

3.9.3. Ensaios antimicrobianos, fungos e bactérias

Formulações 3, 4, 5, 6 e 7

A suscetibilidade dos micro-organismos *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 6538), *Aspergillus niger* (foi identificado macro e micromorfológicamente no laboratório Biotec – UTFPR/Curitiba) e *Cândida albicans* (cepa ATCC 10231) às formulações: 3 (nanoemulsão de linalol, NCs Lin-LbL₁ e NCs Lin-LbL₂) 4 (nanoemulsão de 1-decanol, NCs 1Dec-LbL₁ e NCs 1Dec-LbL₂), 5 (NCs Eug-PHBV), 6 (NCs Lin-PHBV) e 7 (NCs 1Dec-PHBV), os ativos linalol, 1-decanol e eugenol, além das nanocápsulas sem os ativos: NCs LbL₁ vazias, NCs LbL₂ vazias e NCs PHBV vazias, foi analisada pelo método de microdiluição em caldo, conforme previsto pelas normas da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS): M7-A6 para bactérias, M38-A para fungos filamentosos e M27-A2 para leveduras (2017).

As bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) foram previamente cultivadas em ágar Mueller Hinton (MH) por 24 h a 35 °C. Os fungos foram previamente cultivados em BDA. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* foi incubado por 7 dias a 28 °C e a levedura *Candida albicans* por 24 h a 35 °C.

Para o teste, foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo 100 µL de cada amostra previamente diluída, por diluição seriada, em meio MH para as bactérias e meio caldo *Sabouraud* para os fungos. Em seguida, 100 µL de inóculo microbiano recém preparado em concentrações específicas foi adicionado em todos os poços, a fim de se obter as concentrações finais de $5,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para bactérias, $5,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para o *Aspergillus niger*, $2,5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ para a *Candida albicans*. As microplacas foram incubadas a 28 °C para o *Aspergillus niger* e 35 °C para a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, por 48 e 24 h, respectivamente. A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras foi verificada pela turbidez do meio reacional, analisada em espectrofotômetro (625 nm para bactérias e levedura/ 652 nm para o fungo filamentoso) e expressa em porcentagem de redução do crescimento dos micro-organismos em relação ao controle de crescimento microbiano. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento microbiano visível. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo (água destilada autoclavada) e para os controles positivos padrão amoxicilina (1,0 µg mL⁻¹) para a bactéria *Staphylococcus aureus*, trimetropina (20,0 µg mL⁻¹) para a bactéria *Escherichia coli* e cicloheximida (50,0 µg mL⁻¹) para o fungo *Aspergillus niger* e a levedura *Candida albicans*. Todas as análises foram realizadas em duplicatas e foram realizadas no Departamento de Química e Biologia (Laboratório Biotecnologia) da UTFPR.

3.9.4. Ensaios de repelência da *Bemisia tabaci*

Formulações 3, 4, 6 e 7

Os ensaios de repelência da mosca branca foram realizados utilizando a formulação 3 (nanoemulsão de linalol, NCs Lin-LbL₁ e NCs Lin-LbL₂), formulação 4 (nanoemulsão de 1-decanol, NCs 1Dec-LbL₁ e NCs 1Dec-LbL₂), formulação 6 (NCs Lin-PHBV) e formulação 7 (NCs 1Dec-PHBV), como controle negativo foi usada água purificada.

As mudas de tomateiro foram produzidas a partir das sementes do cultivar Santa Cruz Kada em bandejas de isopor contendo substrato. Após o desenvolvimento das mudas (25 dias), as plantas foram transferidas para vasos de 25 L. Após 30 dias, os vasos com as plantas foram transferidos para uma casa de vegetação situada no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, em Londrina, PR. Essa casa de

vegetação estava infestada com insetos da espécie *Bemisia tabaci*. Cada planta foi pulverizada com as amostras citadas acima e acondicionadas a uma distância de 0,6 m uma da outra em uma bancada de madeira dentro da casa de vegetação (FIGURA 19).

FIGURA 19 - TOMATEIROS CONTENDO OS TRATAMENTOS PARA A REPELÊNCIA DA MOSCA BRANCA



FONTE: Ventura (2021)

As avaliações em relação ao número de adultos da mosca branca em cada uma das plantas foram realizadas após 12 e 36 h da instalação do experimento. As plantas foram analisadas cuidadosamente e o número de insetos adultos por planta foi registrado. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três repetições. Este experimento foi realizado no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR) em Londrina em parceria com a Universidade Estadual de Londrina.

3.10. ANÁLISE DOS DADOS

A Análise de Componentes Principais ou PCA (Principal Component Analysis) foi realizada no *software* Matlab 7.0.1 (Mathworks Inc., Natick, MA, USA), utilizando a normalização como pré-processamento.

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* Graphpad Prism 8.0, usando análise de variância, ANOVA *one-way* seguido pelo teste Post-Hoc de Tukey ($p < 0,05$). Para as análises de primeira componente principal foi utilizado o *software* Matlab 7.0.1 (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Para a análise do delineamento experimental foi utilizado o *software* Minitab 19 com licença para 30 dias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO COENTRO

Inicialmente foi realizada a extração por hidrodestilação das sementes do coentro e, em seguida, o óleo essencial foi analisado por CG-EM. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST, por comparação dos Índice de Retenção (IRet) e também espectros de massas da literatura (ADAMS, 2005). Os perfis de eluição da fração do óleo essencial e do padrão de alcanos podem ser observados nos cromatogramas presentes na FIGURA A1 (Apêndice).

Na TABELA 2 pode ser observada a identificação de 14 constituintes para o óleo essencial das sementes do *C. sativum*, representando 98,6% dos componentes. Os monoterpenos oxigenados foram os predominantes nas amostras analisadas (88,4%), sendo o linalol ($76,30 \pm 10,80\%$) o composto mais representativo, também relatado em literatura (ÖZEK *et al.*, 2010; LASRAM *et al.*, 2019).

O espectro de massas do linalol (composto majoritário) pode ser observado na FIGURA A2 (Apêndice). Este composto é um álcool monoterpênico acíclico amplamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética (APROTOSOAIE *et al.*, 2014). Além disso, apresenta atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar (PRAKASH *et al.*, 2019).

Guo e colaboradores (2020) mostraram os vários mecanismos de ação do linalol frente a bactéria *Shewanella putrefaciens*, sendo ela uma das bactérias responsáveis por doenças infecciosas da pele. Os autores apontam que o linalol promoveu uma alteração das membranas celulares expelindo o líquido citoplasmático, além de ter modificado o metabolismo dos aminoácidos, dos carboidratos e dos lipídeos dessas bactérias. Com isso, esse composto conseguiu promover uma proteção contra o desenvolvimento dessas bactérias em alimentos como peixes.

Em relação à repelência, alguns estudos sugerem que o óleo essencial do *C. sativum* contendo o linalol como componente majoritário, atua como um bom repelente frente ao vetor *Aedes albopictus* (mosquito tigre asiático), responsável pela transmissão da dengue, chikungunya e febre amarela (BENELLI *et al.*, 2013). Entretanto, Sacchetti e colaboradores (2015) observaram que em experimentos de repelência à *Bemisia tabaci*, o linalol atuou como atrativo. Além do linalol ser

considerado um atrativo para muitos polinizadores, herbívoros e parasitas, esses resultados podem estar relacionados ao seu sinergismo com outros componentes, visto que os testes foram realizados com o óleo essencial das sementes do *C. sativum*. Outro fator relatado pelos autores é a quiralidade do linalol que pode afetar sua bioatividade, uma vez que o linalol (FIGURA 20) ocorre naturalmente com duas formas isoméricas, o 3*R*-(-)-linalol e 3*S*-(+)-linalol (APROTOSOAIÉ *et al.*, 2014). Entretanto, o mecanismo não é muito bem estabelecido.

TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS SEMENTES DE *C. sativum* POR MEIO DE CG-EM

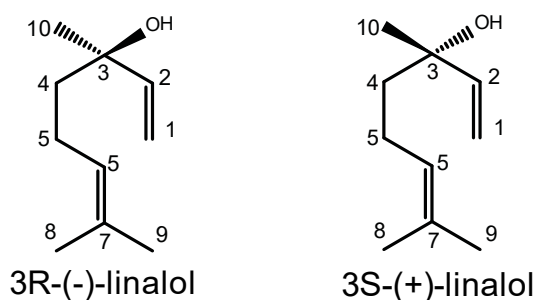
	t_R	I_{Ret}	I_{Ret}_{teórico}	Composto	AR%
1	6,4	931	932	α-Pineno	2,60±1,40
2	7,2	947	946	Canfeno	0,34±0,20
3	8,4	987	988	Mirceno	0,34±0,10
4	9,7	1022	1022	p-Cimeno	1,48±0,20
5	9,9	1027	1024	Limoneno	1,39±0,70
6	11,1	1055	1054	γ-Terpineno	3,70±1,20
7	12,3	1082	1086	Terpinoleno	0,30±0,01
8	13,0	1101	1095	Linalol	76,30±10,80
9	15,0	1143	1141	Cânfora	5,10±2,00
10	16,1	1168	1165	Borneol	0,74±0,60
11	17,2	1192	1186	α-Terpineol	0,47±0,31
12	18,7	1225	1223	Citronelol	0,34±0,10
13	19,7	1248	1249	Geraniol	4,30±2,70
14	25,4	1376	1379	Acetato de geranila	1,20±0,40
Monoterpenos hidrocarbonetos					10,2
Monoterpenos oxigenados					88,4
Total					98,6

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: t_R – Tempo de retenção; I_{Ret} – Índice de retenção; I_{Ret}_{teórico} – Índice de retenção teórico; AR% – Área relativa em porcentagem.

Huff e Pitts (2019) descreveram que o receptor odorífero de *Anopheles gambiae* pode ser ativado com o 3*R*-(-)-linalol. No entanto, quando há uma mistura com maior quantidade de 3*S*-(±)-linalol é observada uma resposta muito mais potente dos receptores. Os autores não avaliaram 3*S*-(+)-linalol isolado, relatando que não foi encontrado comercialmente e a síntese seria extremamente cara.

FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ENANTIÔMEROS 3R-(-)-LINALOL E 3S-(+)-LINALOL



FONTE: Adaptado de Aprotosoiaie *et al.* (2014)

Após a extração e identificação do óleo essencial das sementes, foi realizada a identificação do óleo essencial das folhas do *C. sativum*. Para isso, foi empregada a técnica de *SPME* como técnica de extração e pré-concentração de compostos orgânicos voláteis. A fibra de PDMS/DVB consegue incluir a extração de um amplo espectro de compostos, desde menos polares até polares. Foi encontrada na literatura a descrição do uso da fibra de PDMS, a qual permitiu a identificação dos compostos orgânicos voláteis presentes nas folhas e caule do *C. sativum* (DENG *et al.*, 2003). A identificação dos constituintes das amostras foi realizada por comparação do espectro de massas e dos valores de IRet para colunas não polares com 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano, disponíveis nas bases de dados e espectros de massas da literatura (ADAMS, 2005).

Nas TABELAS 3 e 4 podem ser observados os compostos obtidos para cada condição utilizada, Condição A (maceração em nitrogênio líquido) e Condição B (maceração em temperatura ambiente), respectivamente. Para a Condição A foram identificadas 27 substâncias, sendo as substâncias em maior quantidade o (2*E*)-dodecenal ($25,1 \pm 2,7\%$) e o decanal ($23,5 \pm 6,7\%$) (TABELA 3). Para a Condição B foram identificadas 36 substâncias, sendo os compostos mais representativos o 1-decanol ($17,9 \pm 1,4\%$) e o (2*E*)-dodecenal ($9,1 \pm 1,2\%$) (TABELA 4). Os cromatogramas para ambas as condições podem ser observados na FIGURA A3 (Apêndice), assim como o cromatograma para o padrão de alcanos. Nota-se que na Condição A ocorre a maior presença de compostos com a função aldeído, esse fato pode estar relacionado com o nitrogênio utilizado para o preparo das amostras, uma vez que baixas temperaturas proporcionam maior estabilidade desses compostos, mantendo-os mais presentes no meio. Na Condição B pode estar ocorrendo a

oxidação dos compostos contendo a função aldeído para ácidos carboxílicos, e isso faz com que o equipamento perca a sensibilidade em identificá-los.

TABELA 3 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO *C. sativum* UTILIZANDO A CONDIÇÃO A (CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO) POR MEIO DE CG-EM

	t_R	I _{Ret}	I _{Ret} _{teórico}	Composto	AR %		
					CA1	CA2	CA3
1	4,9	900	900	<i>n</i> -Nonano	0,29	0,33	1,05
2	5,2	908	907	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-Hexadienal	0,21	0,11	-
3	8,2	1000	1000	Decano	-	-	0,12
4	9,4	1029	1026	1,8-Cineol	0,19	0,05	-
5	9,8	1039	1036	Fenilacetaldéido	0,11	0,06	0,10
6	10,5	1055	1049	(2 <i>E</i>)-1-Octenal	0,13	-	-
7	12,2	1098	1095	Linalol	0,28	0,06	0,49
8	12,5	1103	1100	Nonanal	0,10	0,08	0,17
9	14,2	1142	1140	Canfora	0,22	0,05	-
10	17,0	1205	1201	Decanal	16,31	21,80	32,46
11	19,5	1260	1260	(2 <i>E</i>)-Decenal	6,36	15,92	5,05
12	20,0	1271	1266	1-Decanol	-	0,10	0,15
13	20,4	1281	1283	Acetato de isobornila	0,37	0,03	-
14	20,9	1292	1292	(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-Decadienal	0,10	0,06	0,09
15	21,6	1306	1305	Undecanal	7,96	6,23	13,34
16	24,0	1362	1357	(2 <i>E</i>)-Undecenal	4,55	2,99	3,43
17	26,0	1408	1408	Dodecanal	4,51	5,55	9,29
18	28,3	1465	1464	(2<i>E</i>)-Dodecenal	27,86	26,21	21,35
19	30,1	1509	1509	Tridecanal	0,26	0,34	0,50
20	31,8	1551	1559	Germacreno B	0,44	0,17	0,50
21	32,4	1567	1567	(2 <i>E</i>)-Tridecen-1-al	2,19	1,74	1,82
22	33,7	1600	1600	Hexadecano	0,11	-	-
23	34,1	1611	1611	Tetradecanal	0,13	0,13	0,18
24	36,3	1670	1673*	(2 <i>E</i>)-Tetradecenal	10,21	10,29	5,81
25	40,0	1772	-	Pentadecenal	2,01	1,60	1,20
26	42,2	1836	1837*	Neofitadieno	4,95	1,43	1,30
27	43,5	1875	1877*	(2 <i>E</i>)-Hexadecenal	0,35	0,20	0,09

TABELA 4 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO *C. sativum* UTILIZANDO A CONDIÇÃO A (CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO) POR MEIO DE CG-EM

		(Continuação)
	Álcoois alifáticos	0,2
	Monoterpenos	0,8
	Hidrocarbonetos alifáticos	0,8
	Aldeídos alifáticos	93,4
	Outros	3,6
	Total	98,8 ± 0,4

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: t_R – Tempo de retenção; IRet – Índice de retenção; $IRet_{teórico}$ – Índice de retenção teórico; AR% – Área relativa em porcentagem; - Não observado na repetição correspondente.

NOTA: * Dado extraído do Web book NIST. ** Dado de IRet teórico não achado, mas foi atribuída a estrutura pela análise do espectro de massas.

Os espectros de massas para o decanal, (2E)-dodecenal e 1-decanol podem ser observados na FIGURA A4 e A5 (Apêndice). Esses três compostos já foram identificados em folhas de *C. sativum* e testados frente ao inseto *Aedes aegypti*, promovendo satisfatórios efeitos de imunotoxicidade natural (CHUNG *et al.*, 2012).

Kubo e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antibacteriana do (2E)-dodecenal e decanal extraídos do *C. sativum*, e observaram que o (2E)-dodecenal exibe excelente atividade contra *Salmonella choleraesuis*, responsável por inflamações do trato gastrointestinal, com concentração inibitória mínima de 6,25 µg mL⁻¹, já o decanal é menos ativo (100 µg mL⁻¹). Essa inibição pronunciada foi atribuída às propriedades de surfactantes não iônico do (2E)-dodecenal. Além disso, ambos os compostos agem na membrana externa das bactérias, mas com permeabilidades diferentes.

Álcoois de cadeia média como o 1-decanol, também já foram testados contra micro-organismos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*. Os autores observam que esse composto causou danos às membranas celulares da bactéria, facilitando o extravasamento de íons de potássio (K⁺) (TOGASHI *et al.*, 2007).

Em relação à atividade repelente, Ali e colaboradores (2020), observaram que álcoois graxos como o 1-decanol foram mais eficientes que álcoois graxos contendo oito carbonos em sua cadeia, promovendo uma repulsão do *Aedes aegypti* (mosquito da dengue ou pernilongo rajado), vetor da doença da dengue.

TABELA 4 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO *C. sativum* UTILIZANDO A CONDIÇÃO B (MACERAMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE) POR MEIO DE CG-EM

	t_R	I _{Ret}	I _{Ret} _{teórico}	Composto	AR%		
					CB1	CB2	CB3
1	4,9	900	900	<i>n</i> -Nonano	1,70	1,08	16,75
2	8,2	1000	1000	<i>n</i> -Decano	0,17	0,13	1,82
3	8,4	1004	1001	Acetato de (3 <i>E</i>)-hexenila	8,71	5,97	2,36
4	8,6	1010	1007	Acetato de hexila	0,23	0,53	0,10
5	8,7	1013	1010	Acetato de (2 <i>E</i>)-hexenila	0,29	0,54	0,11
6	9,3	1027	1024	Limoneno	-	-	0,28
7	9,4	1029	1026	1,8-Cineol	0,16	0,07	-
8	9,8	1039	1036	Fenilacetaldeido	0,10	0,13	0,38
9	10,5	1055	1055	γ -Terpineno	-	0,14	0,50
10	12,2	1098	1095	Linalol	0,33	0,29	2,84
11	12,3	1100	1100	Undecano	-	-	0,56
12	12,7	1108	1107	Fenil etil álcool	0,17	0,27	0,47
13	14,2	1142	1141	Canfora	0,15	-	-
14	17,0	1205	1201	Decanal	6,40	8,47	7,93
15	19,5	1260	1260	(2 <i>E</i>)-Decenal	2,50	3,94	1,66
16	19,8	1267	1268	(2 <i>E</i>)-Dodecenol	4,32	4,34	1,47
17	20,0	1271	1266	1-Decanol	19,15	15,95	18,71
18	20,4	1281	1283	Acetato de isobornila	0,27	-	-
19	21,6	1306	1305	Undecanal	2,62	3,49	3,64
20	22,3	1322	1323	Decanoato de metila	-	-	0,27
21	24,0	1362	1357	(2 <i>E</i>)-Undecenal	0,66	0,78	0,72
22	24,2	1368	1365	(2 <i>E</i>)-1-Undecenol	0,39	0,43	0,37
23	24,4	1372	1367	Undecanol	0,57	0,78	0,65
24	24,7	1379	1378	Hexanoato de (3 <i>Z</i>)-hexenila	0,42	0,27	0,29
25	26,0	1408	1408	Dodecanal	3,45	4,20	3,67
26	28,3	1464	1464	(2<i>E</i>)-Dodecenal	10,87	8,28	8,21
27	28,5	1469	1469	(2 <i>E</i>)-1-Dodecenol	5,37	4,24	5,65
28	30,1	1509	1509	Tridecanal	0,23	0,35	0,36

TABELA 4 - COMPOSTOS ORGÂNICOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO *C. sativum* UTILIZANDO A CONDIÇÃO B (MACERAMENTO EM TEMPERATURA AMBIENTE) POR MEIO DE CG-EM

(Continuação)							
29	30,7	1523	1524	Dodecanoato de metila	0,13	0,11	0,36
30	31,8	1551	1559	Germacreno B	0,77	0,23	2,46
31	32,4	1567	1567	(2E)-1-Tridecenal	0,72	0,83	0,79
32	34,1	1611	1611	Tetradecanal	0,26	0,36	0,42
33	36,3	1670	1673*	(2E)-Tetradecenal	10,92	11,85	5,79
34	40,0	1772	**	Pentadecenal	1,94	3,40	2,32
35	42,2	1836	1837*	Neofitadieno	3,10	2,68	4,95
36	43,5	1875	1877**	(2E)-Hexadecenal	0,59	0,70	0,36
Monoterpenos						1,9	
Hidrocarbonetos alifáticos						6,6	
Álcoois alifáticos						36,5	
Aldeídos alifáticos						41,4	
Outros						12,2	
Total						98,5 ± 0,2	

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: t_R – Tempo de retenção; IRet – Índice de retenção; $IRet_{teórico}$ – Índice de retenção teórico; AR% – Área relativa em porcentagem; - Não observado na repetição correspondente.

NOTA: * Dado extraído do Web book NIST. ** Dado de IRet teórico não achado, mas foi atribuída a estrutura pela análise do espectro de massas.

Nesta direção, esses compostos majoritários obtidos tanto das sementes como das folhas do *C. sativum*, podem ser uma alternativa mais sustentável para o controle de uma ampla gama de organismos patogênicos.

Após a identificação dos constituintes, observou-se que juntos os preparos das amostras possibilitaram a obtenção de 41 compostos, alguns compostos diferentes e outros semelhantes entre as condições utilizadas, porém com distintas áreas relativas (%). Para avaliar a inter-relação ou as diferenças entre os métodos de preparo das amostras foi realizada a análise das componentes principais (PCA, sigla do inglês *Principal Component Analysis*) das áreas relativas (%) obtidas para os 41 compostos encontrados. O preparo das amostras foi realizado em triplicatas, totalizando 6 amostras. Na PCA uma melhor distinção entre os diferentes procedimentos de preparo de amostra foi observada aplicando a normalização na etapa de pré-processamento dos dados e empregando três componentes principais que, juntas, somaram 96,42% da variância dos dados (74,42 % para PC1, 18,97%

para PC2 e 3,03% para PC3 – FIGURA 21A). De acordo com o gráfico de *scores* de PC1xPC2 (FIGURA 21B) é possível observar o agrupamento das triplicatas das diferentes extrações em dois grupos diferentes, um referente às amostras submetidas ao preparo das amostras na Condição A – CA (nitrogênio líquido) e o outro relativo à Condição B – CB (temperatura ambiente). Os dois conjuntos de amostras apresentaram diferenças de acordo com a PC1, contudo os agrupamentos estão em lados opostos nos *scores* referentes à PC2, sendo as amostras obtidas por extração em temperatura ambiente (Condição B) situadas no lado positivo da PC2, enquanto as amostras obtidas por extração com nitrogênio líquido (Condição A) estão no lado negativo da PC2. Esses resultados indicam que o procedimento de preparo da amostra interfere diretamente na composição, assim como na determinação dos compostos por HS-SPME-GC-EM, como discutido previamente no texto acima, sobre a possibilidade de temperaturas baixas favorecerem a presença de compostos com a função aldeído.

De acordo com os *loadings* da PC1 (FIGURA 21C) é possível evidenciar que os compostos 17 (decanal), 20 (decanol), 23 (undecanal) e 30 ((2E)-dodecenal), que possuem *loadings* positivos, têm influência na proximidade das amostras observada no lado positivo nos *scores* da PC1, sendo esses compostos encontrados em maiores teores em ambas as condições de preparo das amostras.

Considerando os *loadings* da PC2 (FIGURA 21D), observa-se que os compostos 1-decanol (20) e (2E)-tetradecenal (38), que apresentam os maiores valores positivos de *loadings* têm grande influência nos agrupamentos das réplicas da Condição B, bem como na distinção entre as amostras em relação a Condição A. Por outro lado, compostos como o decanal (17) e (2E)-dodecenal (30), que apresentaram os *loadings* mais negativos em PC2, são os constituintes que estão em maiores áreas relativas (%) (TABELAS 3 e 4) e, assim, exercem maior influência no agrupamento entre as amostras observado para a Condição A.

FIGURA 21 – ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS (A) VARIÂNCIA DOS DADOS, (B) SCORES DA PCA (PC1 vs PC2), (C) LOADINGS DA PC1, (D) LOADINGS DA PC2

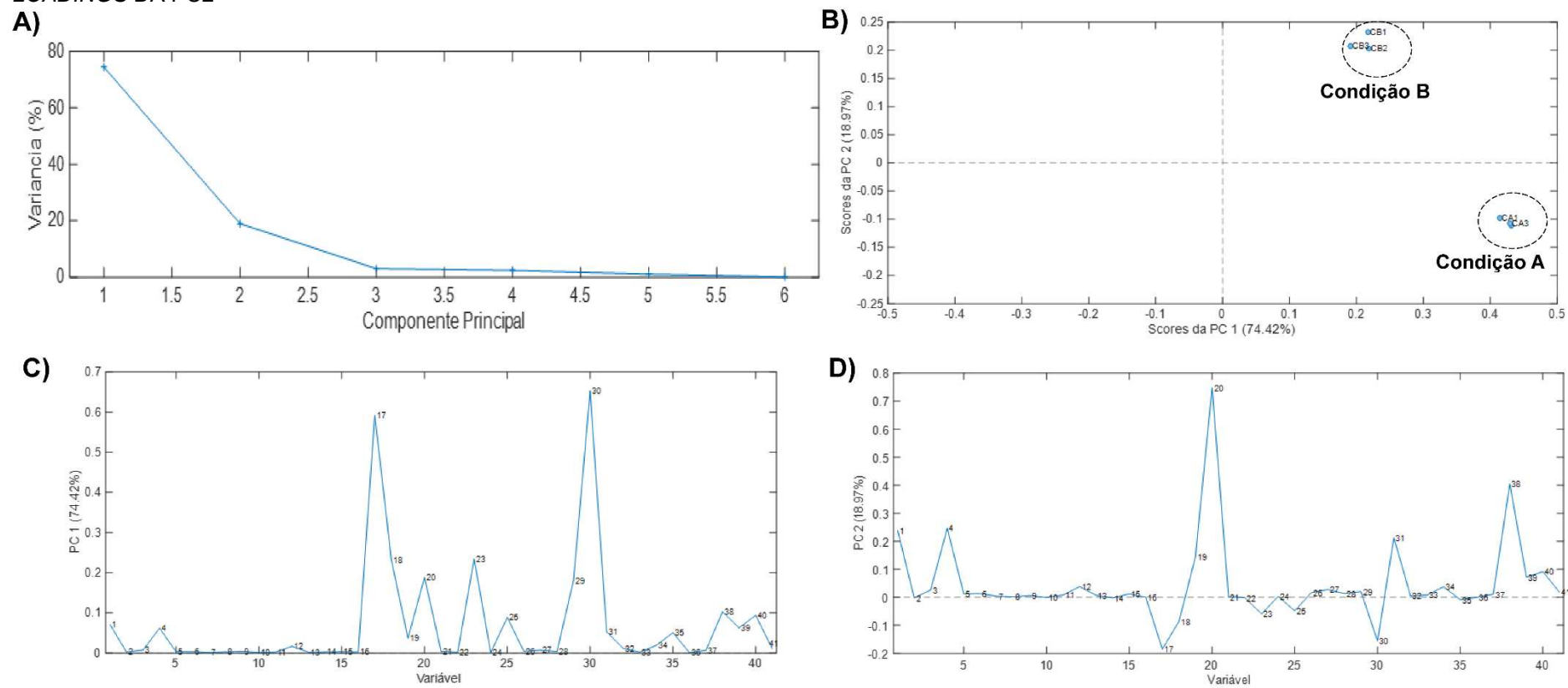
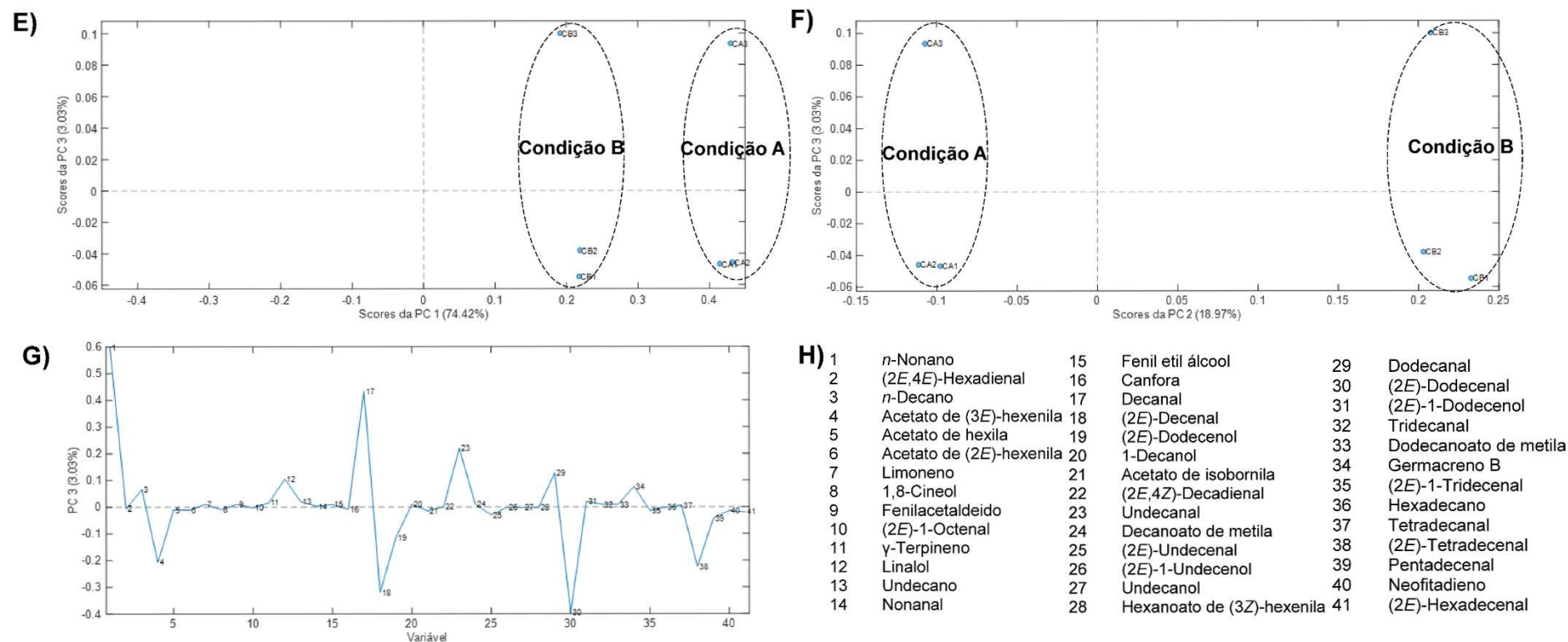


FIGURA 22 – ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS (E) SCORES DA PCA (PC1 vs PC3), (F) SCORES DA PCA (PC2 vs PC3), (G) LOADINGS DA PC3

(Continuação)



FONTE: O autor (2021)

Ao analisar os *scores* da PC3 (FIGURA 22E e 22F) é possível observar uma separação de uma das réplicas das demais em ambas as condições de preparo das amostras (amostras CA3 e CB3). Nos dois casos as amostras encontram-se do lado positivo da PC3. Ao observar os *loadings* desta componente principal (FIGURA 22G), percebe-se que os compostos *n*-nonano (1) e decanal (17) exercem uma maior influência nesta distinção, com valores de *loadings* mais positivos. Estes compostos foram encontrados em teores notavelmente superiores às demais réplicas, conforme pode ser observado nas TABELAS superiores 3 e 4.

Possivelmente isso ocorreu porque as análises foram realizadas de forma intercalada entre as réplicas, iniciando a partir da réplica CA1. Portanto, as amostras CA3 e CB3 permaneceram por mais tempo (5 e 10 h, respectivamente) nos *vials* até a realização da análise, o que pode ter acarretado a maior concentração dos voláteis exalados pelas folhas e, por isso, foi obtida uma área relativa (%) maior. Outro fator que pode ter influenciado é fato de que as amostras são triplicatas independentes. As folhas, entre jovens e velhas, podem conter diferentes teores do óleo essencial acumulado, influenciando no teor total de cada composto encontrado nas diferentes amostras.

Para mitigar tais problemas podem ser adotadas estratégias em relação ao preparo das amostras. Uma das estratégias é preparar cada réplica e analisar em seguida, ou estabelecer um tempo padrão para todas as amostras, evitando dessa forma, que uma amostra permaneça por mais tempo no porta amostra do que as outras. Além disso, pode ser adotado um processo de homogeneização das amostras precedente à análise, possibilitando a aquisição de réplicas com melhor reprodutibilidade o que poderia conferir um melhor agrupamento entre as replicatas.

Tendo em vista que os compostos são exalados pelas plantas à temperatura ambiente o ideal é utilizar a extração por meio da Condição B. Neste sentido, para o andamento do trabalho optou-se por utilizar o composto em maior quantidade extraído pela Condição B, sendo este o 1-decanol. Além disso, optou-se também por utilizar o composto majoritário extraído das sementes do *C. sativum*, o linalol.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ATIVOS, LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL

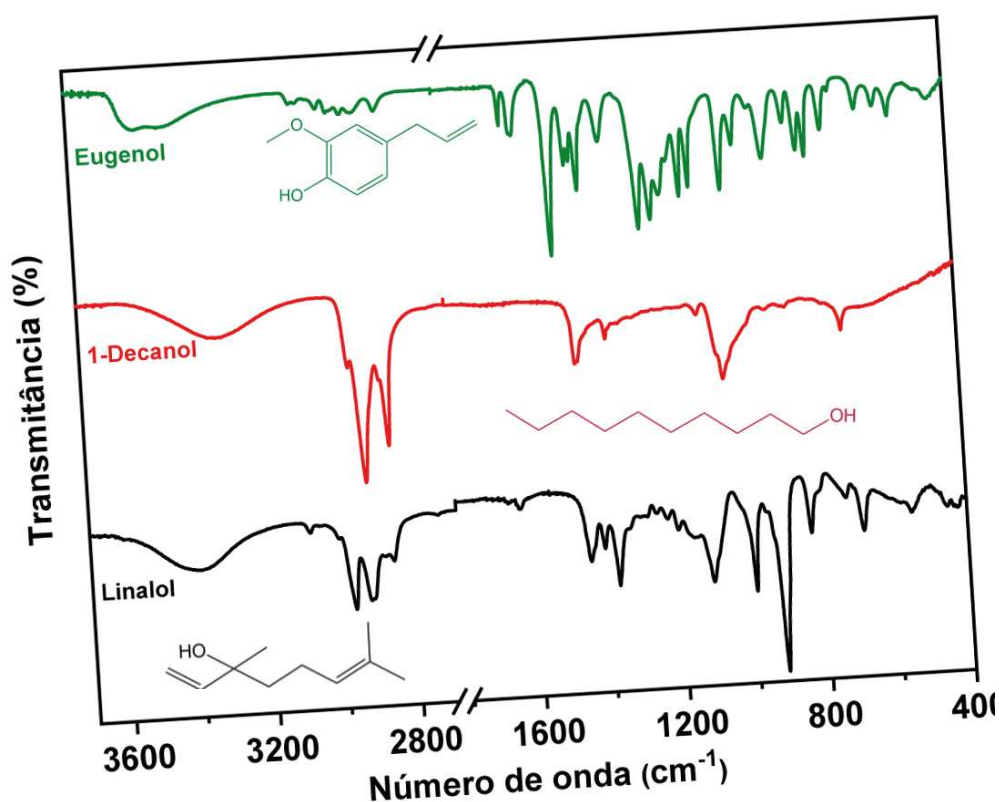
Embora os óleos essenciais ou mesmo seus constituintes isolados tenham sido testados para o controle de vários micro-organismos ou pragas agrícolas existem

poucos produtos comercialmente disponíveis a base deles. Uma das razões da aplicação ser limitada é devido às suas características físico-químicas que envolvem baixa solubilidade aquosa, estabilidade e alta volatilidade (LARIBI *et al.*, 2015). Para atenuar esse problema uma abordagem eficiente é a utilização de nanoencapsulação.

Portanto, para a continuação desse trabalho os constituintes majoritários da semente, linalol, e das folhas, 1-decanol, do *C. sativum* foram utilizados como material de núcleo de nanocápsulas poliméricas para o controle de micro-organismos que podem estar associadas às doenças nas plantas e nos seres humanos. Outro composto promissor para o controle de micro-organismos é o eugenol, ele também foi utilizado como material de núcleo das nanocápsulas poliméricas.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (FIGURA 23) para os três compostos, linalol, 1-decanol e eugenol, apresentam bandas características das suas estruturas e estão sumarizadas na TABELA 5.

FIGURA 23 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO (—) LINALOL, (—) 1-DECANOL E (—) EUGENOL



FONTE: O autor (2021)

Os três compostos apresentam bandas na região entre 3300 a 3517 cm^{-1} referente à hidroxila das suas estruturas. Entre 3067 a 2800 cm^{-1} são bandas relativas

à deformação axial C–H, aparecendo de forma mais acentuada no 1-decanol. A banda próxima a 1640 cm^{-1} pode estar relacionada à deformação axial de ligações duplas entre átomos de carbono presentes no linalol e eugenol. O eugenol apresenta uma banda intensa entre 1609 e 1511 cm^{-1} que pode ser relativa a ligações C=C do anel aromático. A banda intensa em 917 cm^{-1} para o linalol e eugenol pode ser correlacionada à presença do grupo vinil em sua estrutura. Para o 1-decanol a banda na região de 1060 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação axial da ligação C-O (DHOOT *et al.*, 2009; DOROSHENKO *et al.*, 2013; WORANUCH; YOKSAN, 2013; XIAO *et al.*, 2017).

TABELA 5 - BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO OBSERVADAS NOS ESPECTROS DOS COMPOSTOS LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL

Número de onda (cm^{-1})			
Linalol	1-Decanol	Eugenol	Atribuições
3400 (m, l)	3330 (m, l)	3517 (m, l)	deformação axial de O-H
3000 – 2850 (F)	3000 – 2800 (F)	3067 - 2836 (f)	deformação axial de C–H
1640 (f)	-	1641 (m)	deformação axial de C=C do alceno
-	-	1609 – 1511 (F)	deformação axial de C=C do anel aromático
-	1465 (m)	1463	deformação angular de CH_2
-	-	1431 (F)	deformação axial de CH_3 assimétrico
-	-	1374 (F)	deformação axial de CH_3 simétrico
1375 (m)	1376 (f)	-	deformação angular de CH_3 ou C-O-H
1100 (m)	1060 (m)	-	deformação axial de C-O
996 (m, e)	-	-	deformação de C-C
917 (F)	-	917	deformação de C-H (grupo vinil)
832 (m)	-	-	deformação de C–H (alceno trissubstituído)
-	-	724 (m)	deformação angular fora do plano referente ao grupo C–H do anel aromático
-	716 (f)	-	banda referente a álcool de cadeia longa

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Intensidades: m: média, f: fraca e F: forte. Aparência: l: larga, e: estreita.

Adicionalmente, as propriedades físico-químicas dos compostos podem ser observadas na TABELA 6 (National Center for Biotechnology Information, 2021). Pode ser observado que os três compostos possuem massas molares próximas. A diferença mais pronunciada encontra-se na solubilidade desses compostos em água, sendo o menos solúvel o 1-decanol, seguido pelo linalol e eugenol.

TABELA 6 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LINALOL, 1-DECANOL E EUGENOL

Propriedades	Linalol	1-Decanol	Eugenol
Massa molar	154,25 g mol ⁻¹	158,28 g mol ⁻¹	164,20 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	1,580 g L ⁻¹	0,021 g L ⁻¹	2,460 g L ⁻¹
Densidade	0,85 g mL ⁻¹	0,80 g mL ⁻¹	1,06 g mL ⁻¹
Ponto de fusão	< 20 °C	5 – 7 °C	-9 °C
Ponto de ebulição	198 – 199 °C	220 – 235 °C	256 °C

FONTE: National Center for Biotechnology Information (2021)

Além disso, para o linalol foi determinada a atividade ótica e calculado o excesso enantiomérico presente na mistura (±)-linalol por meio da análise de polarimetria. Para o cálculo foi utilizado o enantiômero (-)-linalol. A mistura (±)-linalol apresentou um valor de rotação específica de -0,272, já para o (-)-linalol o valor de rotação específica foi de -14,645. A partir desses valores e utilizando a Equação 9 foi possível obter o excesso enantiomérico (ee) na mistura de (±)-linalol.

$$ee = \frac{[\alpha_{obs}]}{[\alpha_{esp}]} \times 100\% \quad (\text{Eq. 9})$$

onde, $[\alpha_{obs}]$ é o valor específica observado no aparelho para o desvio da amostra e $[\alpha_{esp}]$ é a rotação específica do enantiômero.

O resultado do excesso enantiomérico foi de 1,86%. Dessa forma, pode-se inferir que na mistura (±)-linalol existe 50,9% de 3R-(-)-linalol e 49,1% de 3S-(+)-linalol.

4.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICOS DOS POLÍMEROS E DO SURFACTANTE

Os polímeros e o surfactante também foram caracterizados, uma vez que a quitosana e o PHBV passaram por processo de purificação. As caracterizações físico-químicas da quitosana e da carboximetilcelulose foram realizadas usando a cromatografia por exclusão de tamanho (método absoluto). Na TABELA 7 são apresentados os valores para massa molar média ponderal (M_w), massa molecular numérica média (M_n), raio de giro (R_g), dispersão ($\mathcal{D} = M_w/M_n$), viscosidade intrínseca $[\eta]$, coeficiente de Mark-Houwink (a), concentração crítica (c^*) e recuperação (%). Os

dados foram obtidos usando os valores de 0,189 e 0,163 mL g⁻¹ como incremento do índice de refração (dn/dc) para a quitosana e carboximetilcelulose, respectivamente (WANG *et al.*, 1991; HOOGENDAM *et al.*, 1998).

A concentração crítica (c^*) foi calculada utilizando a Equação 2 (p. 59). Esse parâmetro informa em qual regime se encontra a amostra, diluído ou concentrado. O ideal é a amostra estar em regime diluído, pois acima da c^* pode ocorrer maior entrelaçamentos das cadeias poliméricas. Os valores de c^* foram de 6,1 e 2,3 mg mL⁻¹ para quitosana e carboximetilcelulose, respectivamente, e diante disso as amostras foram caracterizadas por cromatografia por exclusão de tamanho no regime diluído (DOBRYNIN; COLBY; RUBINSTEIN, 1995).

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLÍMEROS QUITOSANA NÃO PURIFICADA, QUITOSANA PURIFICADA E CARBOXIMETILCELULOSE

Parâmetros	Amostras		
	Quitosana não purificada	Quitosana purificada	Carboximetilcelulose
$M_w / 10^5 \text{ g mol}^{-1}$	3,8	1,9	6,7
$\bar{D} = M_w/M_n$	1,8	1,5	3,9
$[\eta] / \text{dL g}^{-1}$	3,1	2,1	1,6
$R_g \text{ Flory-Fox} / \text{nm}$	31,0	23,0	22,6
a	0,7	0,7	0,7
$c^* / \text{mg mL}^{-1}$	5,1	6,1	2,3
Recuperação (%)	75,4	87,5	89,9

FONTE: O autor (2021)

Utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3, p. 59) para determinar o coeficiente “a”, obtém-se informações conformacionais das moléculas. Valores de “a” entre 0 e 0,5 referem-se a moléculas com estruturas esféricas, entre 0,5 e 0,8 conformação ao acaso ou *random coil* e entre 0,8 a 1,0 as cadeias podem ser consideradas expandidas ou rígidas e em formato de bastão (MASUELLI, 2014). O coeficiente “a” obtido foi de 0,7 para ambos os polímeros, indicando que esses polímeros possuem conformação *random coil* e exibem expansão da cadeia, gerada pela maior interação polímero-solvente associado a presença de um bom solvente/eluente (CHEN; TSAIH, 1998; BRUGNEROTTO *et al.*, 2001). Os valores de \bar{D} representam a dispersão da amostra, normalmente valores iguais a 1 correspondem a polímeros monodispersos e maiores que 1 polidispersos. Entretanto, pode ser característico da amostra e pode estar associado ao processo e/ou mecanismo de

polimerização utilizado. Neste trabalho, os polímeros se encontram polidispersos, possivelmente porque o processo de filtração pode retirar moléculas com massas molares maiores diminuindo a polidispersão. Além disso, no processo de purificação houve a perda de cerca de 40% da quitosana podendo influenciar na polidispersão.

Para o PHBV purificado e não purificado também foi utilizada a cromatografia por exclusão de tamanho (método relativo). Na TABELA 8 pode ser observada a diminuição da M_w após a purificação do PHBV, indicando a retirada de impurezas da amostra. Além disso, por meio do quociente M_w/M_n observou-se uma menor heterogeneidade das massas molares para o PHBV purificado.

As estruturas químicas do PHBV purificado e não purificado, quitosana purificada e não purificada e da carboximetilcelulose, foram determinadas utilizando RMN de 1H . Os espectros RMN de 1H do PHBV não purificado e purificado podem ser observados na FIGURA 24A e 24B, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) estão assinalados como HB para porção hidroxibutirato e HV para hidroxivalerato.

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO POLÍMERO PHBV NÃO PURIFICADO E PURIFICADO

	$M_n / 10^5 \text{ g mol}^{-1}$	$M_w / 10^5 \text{ g mol}^{-1}$	$\bar{D} = M_w/M_n$
PHBV não purificado	1,7	2,8	1,6
PHBV purificado	1,8	2,3	1,2

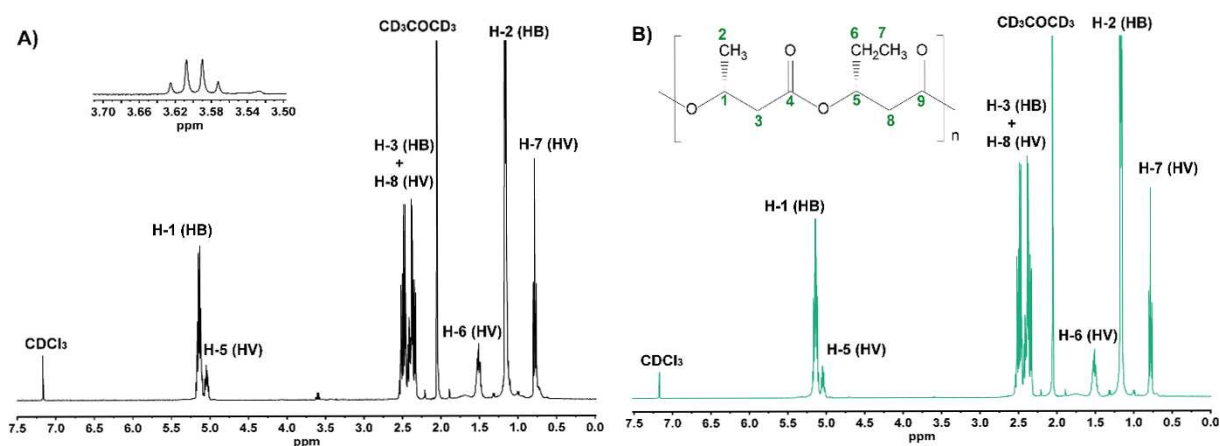
FONTE: O autor (2021)

Ambos foram calibrados a partir do δ da acetona (CD_3COCD_3) em 2,05 ppm. Os δ para o polímero PHBV foram atribuídos de acordo com a literatura (WEI *et al.*, 2014) e podem ser observados na TABELA 9. A diferença observada entre os espectros de RMN de 1H das amostras foi o δ em 3,60 ppm presente no PHBV não purificado, esse sinal pode estar relacionado com algum resíduo proveniente de alguma das etapas para obtenção do PHBV (pré-tratamento da biomassa, extração com solvente e purificação do polímero), como por exemplo, o dietil-éter (CH_2 , δ : 3,48 ppm, quarteto) ou o álcool etílico (CH_2 , δ : 3,72 ppm, quarteto) (FULMER *et al.*, 2010).

O δ na região de 1,15 ppm pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo metila da porção hidroxibutirato. Por outro lado, os δ em 0,78 ppm e 1,51 ppm podem ser a

atribuídos a porção hidroxivalerato dos hidrogênios ligados aos carbonos 6 e 7, respectivamente (WEI *et al.*, 2014).

FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN de ^1H PARA: (A) PHBV NÃO PURIFICADO E (B) PHBV PURIFICADO (CDCl_3 A 25 °C, 400 MHz)



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: HB: hidroxibutirato, HV: hidroxivalerato

TABELA 9 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE ^1H PARA O HIDROXIBUTIRATO (HB) E HIDROXIVALERATO (HV) FORMADORES DO PHBV

δ (ppm)		Atribuições	
		HB	HV
0,78	triplete	-	H – C7
1,15	duplete	H – C2	-
1,51		-	H – C6
2,05	CD_3COCD_3 (Acetona)	-	-
2,35 e 2,50	multiplete	H – C3	H – C8
5,04		-	H – C5
5,14		H – C1	-
7,17	CDCl_3 (Clorofórmio)	-	-

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: HB: hidroxibutirato, HV: hidroxivalerato

Utilizando os espectros de RMN de ^1H para as amostras de PHBV e as Equações 10 e 11, foi possível calcular os valores percentuais de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV), respectivamente, presentes na cadeia polimérica.

$$\text{HB}(\%) = \left(\frac{A_{\text{CH}_3}(\text{HB})}{A_{\text{CH}_3}(\text{HB}) + A_{\text{CH}_3}(\text{HV})} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$HV(\%) = \left(\frac{A_{CH_3}(HV)}{A_{CH_3}(HV) + A_{CH_3}(HB)} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

em que $A_{CH_3}(HB)$ e (HV) são as áreas correspondentes aos δ do CH_3 no grupo lateral das unidades de repetição do butirato e valerato na cadeia do PHBV.

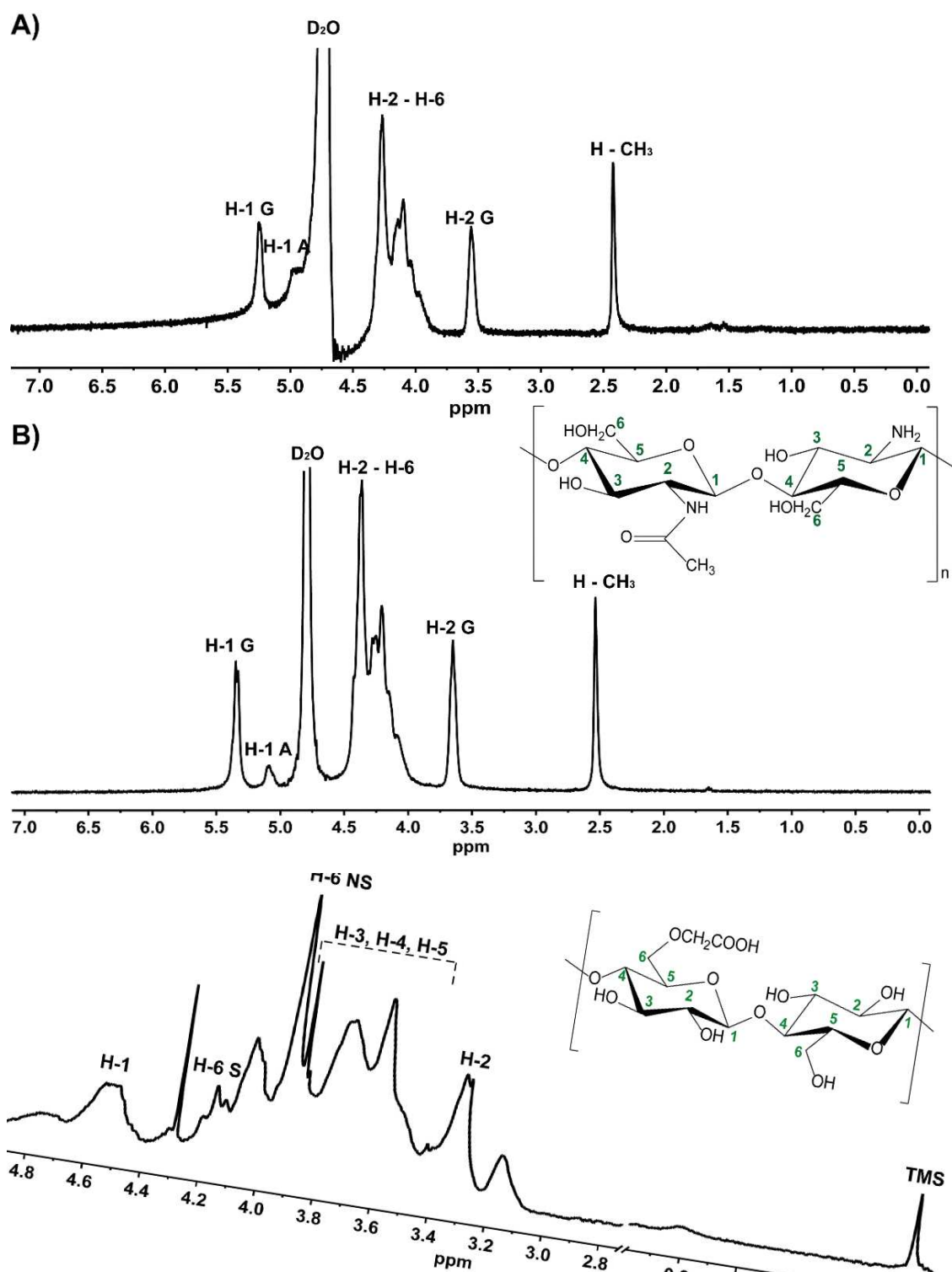
Os percentuais de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) para o PHBV não purificado foram 79,9% e 20,1%, respectivamente. Para o PHBV purificado foram 85,2% e 14,8%, respectivamente. Esses valores mostram que o polímero purificado apresentou uma porcentagem de HV menor, possivelmente devido à perda no processo de purificação, seja pela remoção de frações insolúveis ou por frações de baixa massa molar removidas durante a purificação (RIVERA-BRISO; SERRANO-AROCA, 2018).

Os espectros de RMN de 1H da quitosana não purificada, quitosana e carboximetilcelulose são apresentados na FIGURA 25. Os δ foram atribuídos baseado na literatura (HO; KLOSIEWICT, 1980; FERNANDEZ-MEGIA *et al.*, 2005; KONO, 2013; DOSHI *et al.*, 2017; MATSUHIRO *et al.*, 2018) e podem ser observados na TABELA 10.

Para ambas as quitosanas, os δ em 5,4 e 3,7 ppm correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos 1 (hidrogênio anomérico) e 2 das unidades β -D-glucosamina, respectivamente. Para as unidades β -N-D-acetilglucosamina, o δ em 5,1 ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 1 (hidrogênio anomérico) e os δ entre 2,4 e 2,6 ppm dos hidrogênios da metila dos grupos acetil. Os δ entre 3,9 e 4,4 ppm são sinais sobrepostos atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 das unidades de acetilglucosamina (FERNANDEZ-MEGIA *et al.*, 2005; DOSHI *et al.*, 2017;).

A molécula de carboximetilcelulose exibe δ entre 3,3 e 3,8 ppm atribuído aos hidrogênios dos carbonos 2, 3, 4 e 5 da glucopirranose. Os sinais em 3,9 e 4,2 ppm foram atribuídos para os hidrogênios da glucopirranose ligados ao carbono 6 não substituído e 6' substituído com grupo carboximetil, respectivamente. Em 4,5 ppm foi atribuído para o hidrogênio ligado ao carbono 1 da glucopirranose (HO; KLOSIEWICT, 1980; KONO, 2013; MATSUHIRO *et al.*, 2018).

FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN de ^1H PARA: (A) QUITOSANA NÃO PURIFICADA, (B) QUITOSANA PURIFICADA ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COOD}$ A 70°C , 400 MHz) E (C) CARBOXIMETILCELULOSE (D_2O A 70°C , 400 MHz)



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A: acetilglucosamina, G: glucosamina, S: substituído, NS: não substituído, *as imagens na figura indicam a estrutura química da quitosana e da carboximetilcelulose.

TABELA 10 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE ^1H PARA A QUITOSANA E PARA A CARBOXIMETILCELULOSE

Atribuições		
δ (ppm)	Quitosana	Carboximetilcelulose
2,4-2,6	H – metila	
3,3-3,8		H – C2, C3, C4 e C5
3,7	H – C2 – glucosamina	
3,9		H – C6 – não substituído
3,9-4,4	H – C3, C4, C5 e C6	
4,2		H – C6 – substituído
4,5		H – C1
5,1	H – C1 – acetilglucosamina	
5,4	H – C1 – glucosamina	

FONTE: O autor (2021)

O grau de desacetilação (GD) representa a quantidade em porcentagem de grupos amino presentes na cadeia polimérica da quitosana. Por meio da Equação 12 e do espectro de RMN de ^1H da amostra de quitosana purificada foi possível calcular o GD.

$$\text{GD}(\%) = \left(\frac{I_{\text{H1-G}}}{I_{\text{H1-G}} + I_{\text{H1-A}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

em que $I_{\text{H1-G}}$ é a integral para o hidrogênio ligado ao carbono 1 da unidade glucosamina (5,4 ppm) e $I_{\text{H1-A}}$ é a integral para hidrogênio ligado ao carbono 1 da unidade acetilglucosamina (5,1 ppm).

O valor de GD da quitosana obtido a partir do espectro de RMN de ^1H foi de 76%, igual ao obtido por titulação potenciométrica (Equação 13, FIGURA 26a) (LAVERTU *et al.*, 2003; DOSHI *et al.*, 2017). Esse valor indica que 76% da molécula de quitosana é composta por grupamentos $-\text{NH}_2$ ao longo da sua cadeia polimérica. No caso da titulação potenciométrica, o gráfico de pH *versus* volume de NaOH foi obtido mostrando curvas com diferentes inflexões. O primeiro ponto de inflexão é devido a neutralização do excesso do ácido clorídrico utilizado para dispersar a quitosana e o último ponto de inflexão corresponde a neutralização dos grupos aminos protonados (NH_3^+) presentes na dispersão.

$$GD(\%) = \left(\frac{161(V_2 - V_1)}{m} \right) M \times 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

em que 161 g mol⁻¹ é a massa molar do grupo amino da quitosana, V₁ é o volume do primeiro ponto de inflexão (neutralização do excesso de ácido) em L, V₂ é o volume do último ponto de inflexão (neutralização dos grupos –NH₃⁺ da quitosana) em L, M é a concentração em mol L⁻¹ da solução aquosa de NaOH utilizada como titulante e m é a massa (g) do polímero utilizado.

O grau de substituição (GS) da carboximetilcelulose foi obtido por titulação potenciométrica (EYLER *et al.*, 1947; TOĞRUL; ARSLAN, 2003; KONO 2013; KONO *et al.*, 2016) e utilizando as Equações 14 e 15. A FIGURA 26b mostra a curva de titulação.

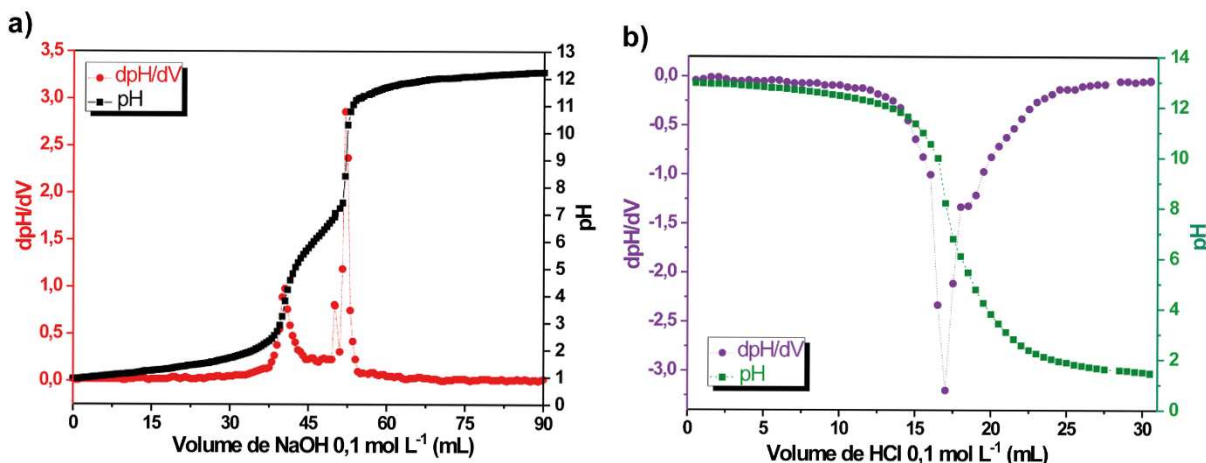
$$A(\%) = \left(\frac{(V_b - V_s) \times M \times 0,059}{m} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$DS = \left(\frac{162 \times A}{[5900 - (58 \times A)]} \right) \quad (\text{Eq. 15})$$

em que A são os grupos carboxila (%), V_b é o volume (mL) da solução aquosa de HCl para titular o branco (NaOH), V_s é o volume (mL) da solução aquosa de HCl para titular a amostra, M é a concentração da solução aquosa de HCl (0,1 mol L⁻¹) e m é a massa da amostra de carboximetilcelulose (g). 162 g mol⁻¹ é a massa molar do monômero da celulose (unidade de glucose anidra) e o 58 g mol⁻¹ é referente ao aumento da massa devido a monossustituição.

O valor de GS obtido foi de 0,84, próximo ao valor reportado pelo fabricante (0,90). O GS é importante, pois está relacionado com a solubilidade da molécula em água, quanto maior esse valor mais solúvel é a carboximetilcelulose (HEINZE; KOSCHELLA, 2005).

FIGURA 26 - CURVA DE TITULAÇÃO POTENCIMÉTRICA E PRIMEIRA DERIVADA DA: (a) QUITOSANA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH versus VOLUME DA SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) CARBOXIMETILCELULOSE EM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH versus VOLUME DA SOLUÇÃO AQUOSA DE HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$)



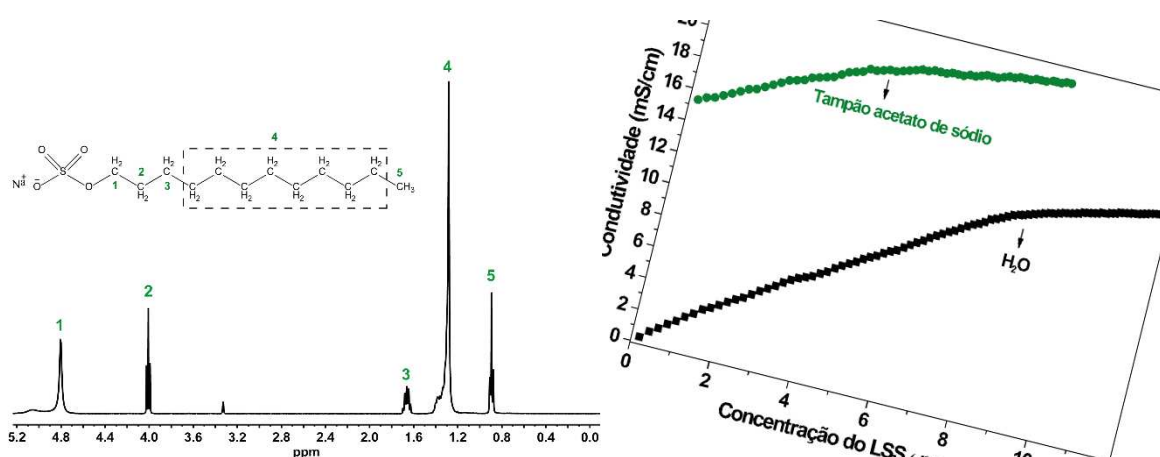
FONTE: O autor (2021)

Após a caracterização dos polímeros, foi realizada a caracterização do lauril sulfato de sódio. Na FIGURA 27a é apresentado o espectro de RMN de ^1H do lauril sulfato de sódio e os δ foram assinalados de acordo com a literatura (PEREIRA *et al.*, 2013). O δ em 0,8 ppm pode ser relativo ao hidrogênio pertencente a metila terminal (CH_3) do surfactante. Na faixa entre 1,1 e 1,4 ppm os sinais referem-se aos hidrogênios metilênicos (CH_2)₈. Em 1,6 ppm são sinais de hidrogênios β -metilênico (CH_2). Já o δ em 3,3 ppm é referente ao solvente utilizado (CD_3COD , metanol deuterado) e o δ em 4,0 ppm atribui-se aos hidrogênios do grupo α -metilênico (CH_2) do lauril sulfato de sódio (PEREIRA *et al.*, 2013).

Para que as micelas de lauril sulfato de sódio fossem obtidas, a titulação condutométrica e as Equações 4 e 5 (p. 61) foram usadas para determinar a concentração micelar crítica (cmc) (FIGURA 27b) e os valores de α , respectivamente. A cmc do lauril sulfato de sódio em água foi de $0,0082 \text{ mol L}^{-1}$ próximo ao observado em literatura ($0,0085 \text{ mol L}^{-1}$) (MOTIN *et al.*, 2015). Por outro lado, a cmc do lauril sulfato de sódio em tampão acetato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,6) foi $0,0047 \text{ mol L}^{-1}$. O valor mais baixo de cmc observada para o tampão acetato de sódio foi atribuída à presença de íons sódio (Na^+) em solução, responsáveis pela estabilização das cargas negativas do lauril sulfato de sódio, reduzindo assim a repulsão da cabeça polar. Além disso, diferenças de valores de pH do meio podem resultar em valores diferentes para cmc (FUGUET *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2018).

Os valores de α para o lauril sulfato de sódio em água e tampão acetato de sódio foram de 0,42 e 0,41, respectivamente, sugerindo que a ionização do surfactante é semelhante nas duas condições experimentais. Apesar do grau de ionização, em tese, ser diferente entre os dois solventes, a titulação condutométrica não demonstrou sensibilidade na identificação do efeito do solvente sobre o “ α ” (DOMINGUEZ *et al.*, 1997).

FIGURA 27 - (a) ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO ($\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{COD}$ A 20 °C, 400 MHz), (b) CURVAS DE TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO EM ÁGUA (PRETO) E EM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,01 mol L $^{-1}$ (VERDE)



FONTE: O autor (2021)

A determinação dos parâmetros físico-químicos dos polímeros e surfactante são importantes para a compreensão da formação e ação das nanocápsulas contendo multicamadas e das nanocápsulas de PHBV. Como observado por alguns autores (ING *et al.*, 2012 e LI *et al.*, 2017), características como M_w , GD e GS apresentam influência significativa na obtenção e atividade de materiais em escala nano ou micrométrica. A solubilidade da quitosana é altamente dependente do GD, quanto mais desacetilada mais solúvel em meio ácido abaixo do seu pK_a (6,5). No caso da M_w , a quitosana com alta massa molar pode dar origem a nanocápsulas com tamanho maiores quando comparada com quitosana de baixa massa molar (ING *et al.*, 2012). Em relação à carboximetilcelulose, o GS pode afetar diretamente a solubilidade, as propriedades espessantes e sua estabilidade (LI *et al.*, 2017). No PHBV a porção hidroxivalerato melhora as propriedades de compatibilidade biológica, termoprocessabilidade e biodegradabilidade (TEBALDI *et al.*, 2019). Em relação ao surfactante, a autoagregação para formação de micelas muda de acordo com o meio

utilizado. Neste caso foi necessário determinar a cmc do lauril sulfato de sódio no meio (tampão acetato de sódio) utilizado para a formação das nanoemulsões e nanocápsulas. Uma vez que as caracterizações dos polímeros e do surfactante foram realizadas, foram iniciados os estudos para obtenção das nano e microcápsulas por autoassociação LbL e as nanocápsulas de PHBV por deposição interfacial, utilizando o linalol, 1-decanol e eugenol como materiais de núcleo.

4.4. FORMAÇÃO DA NANOEMULSÃO E DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS

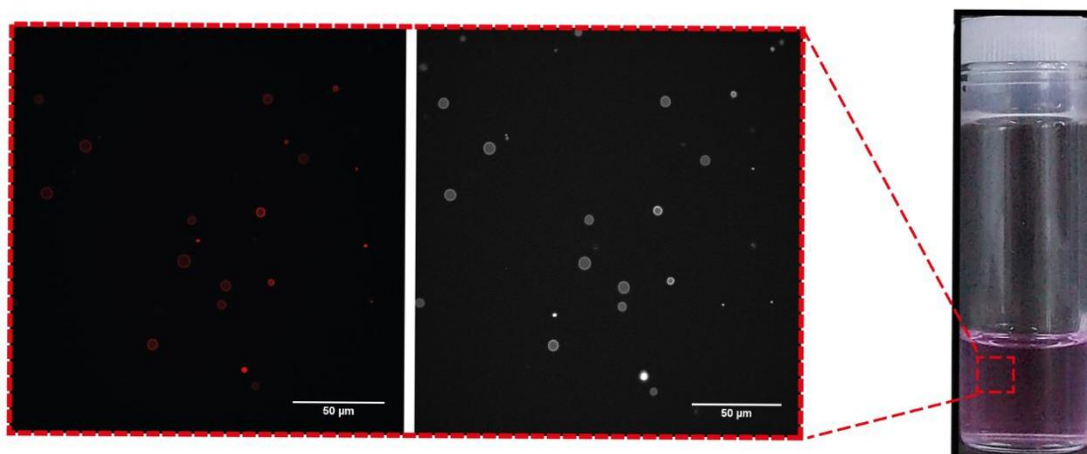
Para comprovar a formação das gotículas por meio da mistura lauril sulfato de sódio e eugenol, foi utilizada a microscopia confocal de varredura a laser. Devido às limitações do equipamento para observar estruturas pequenas foi aumentada a quantidade de eugenol e lauril sulfato de sódio para a formação de gotículas maiores. O eugenol foi colocado em contato com o fluoróforo rodamina e a emulsão preparada 16 h antes da análise. Na FIGURA 28 é possível observar a interação entre os materiais, assim como a formação das gotículas esféricas e bem definidas. Acredita-se que o eugenol interaja mais eficientemente com as cadeias carbônicas do lauril sulfato de sódio. Dessa forma, a maior intensidade de fluorescência na borda da gotícula se deve possivelmente pelo excesso de eugenol. Portanto, por meio dessa técnica, foi possível comprovar a formação das gotículas de lauril sulfato de sódio contendo o eugenol e que elas ficaram estáveis em dispersão coloidal minimamente por 16 h. Seguindo esta linha, para evitar a desestabilização dessas gotículas e proteger o ativo de fatores externos, foram iniciados os estudos de revestimento das nanoemulsões com polímeros.

Após a formação da nanoemulsão de lauril sulfato de sódio contendo o eugenol, iniciou-se o desenvolvimento das nanocápsulas com a adição de dispersões de quitosana. Essas dispersões foram testadas em três concentrações diferentes, 2 mg mL⁻¹, 6 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹.

A adição das dispersões de quitosana sobre a nanoemulsão foi acompanhada por meio da análise de potencial ζ e pode ser observada na FIGURA 29. A nanoemulsão apresentou potencial de superfície no plano de cisalhamento em torno de -55 mV, à medida que alíquotas (100 μ L a cada 50 s) das dispersões de quitosana foram sendo adicionadas ocorreu a inversão de potencial de superfície indicando

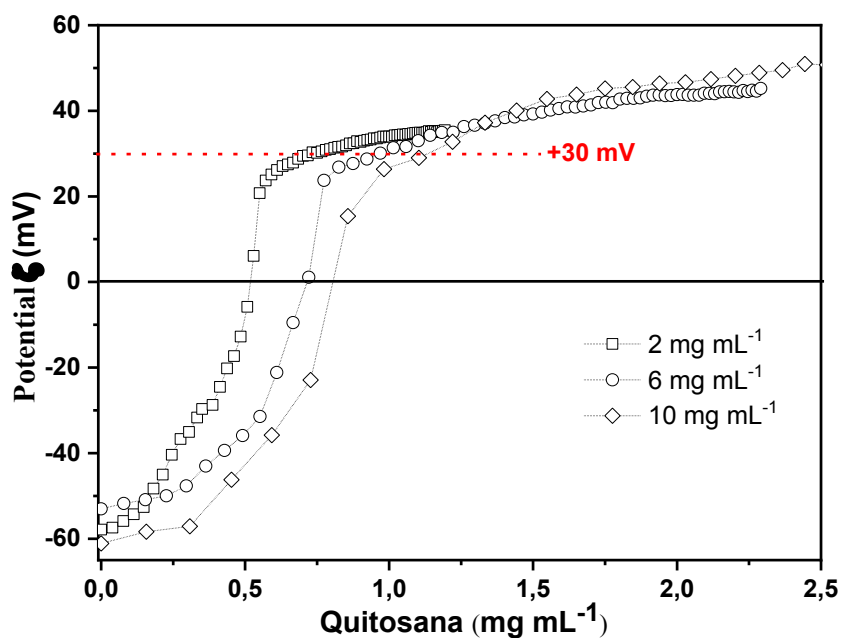
provavelmente o revestimento da nanoemulsão, de forma que as moléculas de quitosana organizam-se sobre a nanoemulsão, recobrindo-a.

FIGURA 28 - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS GOTÍCULAS DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO CONTENDO EUGENOL



FONTE: O autor (2021)

FIGURA 29 - POTENCIAL ζ DURANTE A FORMAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS COM DISPERSÕES DE QUITOSANA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, 2 mg mL⁻¹, 6 mg mL⁻¹ e 10 mg mL⁻¹



FONTE: O autor (2021)

O objetivo dessa análise foi determinar a concentração mais apropriada de quitosana necessária para preparar nanocápsulas estáveis e que utilizasse menor

quantidade de polímero. Em baixos valores de potencial ζ ocorreu uma rápida separação de fase dos sistemas coloidais devido ao predomínio de atrações eletrostáticas entre as nanocápsulas, pois a carga superficial baixa tende a gerar uma agregação do material. Por outro lado, foi observado certa estabilidade em potenciais iguais ou maiores que +30 mV, devido a carga superficial relativamente alta as nanocápsulas se repelem e consequentemente permanecerem dispersas. Entretanto, pode ocorrer a formação de estruturas maiores também, já que nessa análise não é possível um controle de agitação no momento da formação das nanocápsulas. Em linhas gerais, a partir desses dados foi possível escolher a concentração de quitosana, 2 mg mL⁻¹, e o volume mais adequados para a obtenção das nanocápsulas com potencial de superfície apropriado para mantê-las estáveis.

4.4.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol

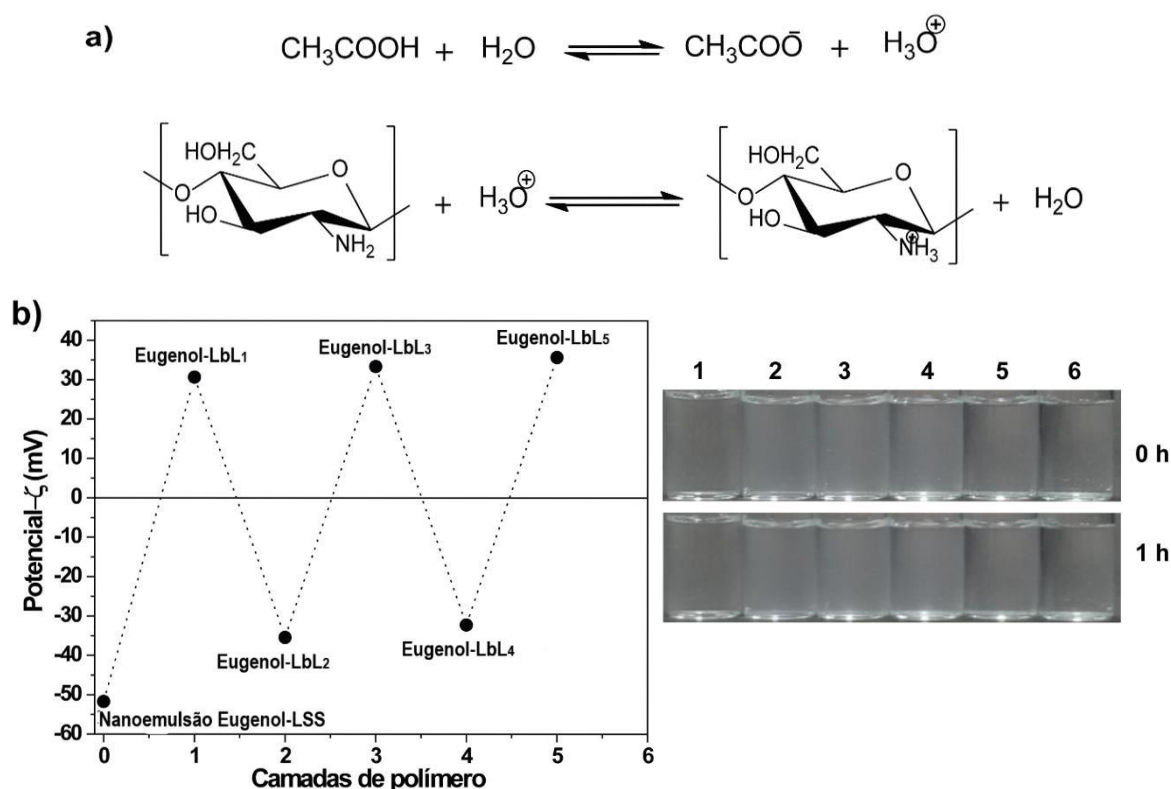
Formulação 1

O uso de polissacarídeos no revestimento de nanoemulsões pode ser uma alternativa para estabilizá-las e protegê-las do meio externo. A quitosana é um polímero linear, e como o grupo amino pode ser protonado em soluções aquosas ácidas (pH < 6,5), por exemplo, ácido acético (FIGURA 30a), há a possibilidade de interações iônicas com moléculas de cargas opostas (MUN; DECKER; MCCLEMENTS, 2006). Neste contexto, o revestimento da nanoemulsão pode ser obtido mediante interações iônicas entre as cargas superficiais opostas do lauril sulfato de sódio (negativa) e quitosana (positiva) em meio ácido. Além disso, o número de camadas poliméricas pode ser aumentado adicionando polímeros como a carboximetilcelulose, que possui o grupo carboxila. Esse grupo pode ser desprotonado em meios com valor de pH acima do seu pK_a, que varia de 2-4, gerando o grupo carboxilato (-COO⁻) (HEINZE; KOSCHELLA, 2005; ZHANG *et al.*, 2013).

A preparação das nanocápsulas (NCs) foi iniciada com a formação da nanoemulsão primária de lauril sulfato de sódio (LSS) contendo o eugenol e denominada de nanoemulsão Eugenol-LSS. Essas gotículas foram subsequentemente revestidas com uma solução de quitosana, resultando nas nanocápsulas com uma camada de polímero e denominadas de NCs Eugenol-LbL₁. A produção das cápsulas seguiu-se com um número crescente de camadas poliméricas alternadas com a deposição de moléculas de carboximetilcelulose e

quitosana. Essa estratégia foi aplicada para garantir uma modulação da liberação do eugenol. A deposição de polímero seguiu a ordem carboximetilcelulose, quitosana, carboximetilcelulose e quitosana até que um máximo de cinco camadas de polímero fosse atingido. As cápsulas obtidas foram nomeadas da seguinte forma: NCs Eugenol-LbL₂, NCs Eugenol-LbL₃, MCs Eugenol-LbL₄ e MCs Eugenol-LbL₅, respectivamente. A deposição das camadas de polímero sobre a nanoemulsão foi acompanhada por análise de potencial ζ mostrando a inversão da carga superficial das cápsulas, no plano de cisalhamento, de acordo com a camada polimérica externa (FIGURA 30b).

FIGURA 30 - (a) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUITOSANA CATIÔNICA, (b) VALORES DE POTENCIAL ζ EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CAMADAS DE POLÍMERO DEPOSITADAS NO DECORRER DO PROCESSO DE AUTOASSOCIAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS, (b) DIREITA: IMAGENS MACROSCÓPICAS DA FORMAÇÃO DAS CÁPSULAS NOS TEMPOS DE 0 h E 1 h



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Na imagem b a direita os números significam: **(1)** Nanoemulsão Eugenol-LSS; **(2)** Nanocápsulas Eugenol-LbL₁; **(3)** Nanocápsulas Eugenol-LbL₂; **(4)** Nanocápsulas Eugenol-LbL₃; **(5)** Microcápsulas Eugenol-LbL₄ E **(6)** Microcápsulas Eugenol-LbL₅

Nas imagens macroscópicas (FIGURA 30b direita) pode-se observar a nanoemulsão Eugenol-LSS (1) e as cápsulas com até cinco camadas poliméricas (2 a 6). Nas cápsulas com cinco camadas, devido à sua densidade, a sedimentação

ocorre rapidamente e pode ser observada no fundo do tubo já na primeira hora de observação. A análise de potencial ζ sugere que o revestimento foi bem-sucedido para todas as cápsulas. Além disso, os valores do potencial foram superiores a 30 mV (positivos ou negativos) para todas as cápsulas, sugerindo estabilidade de todos os sistemas (com exceção das MCs Eugenol-LbL₅ que sedimentaram rapidamente devido ao tamanho).

Após o revestimento e para determinar a composição química das nanocápsulas foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva e espectroscopia na região do infravermelho. Para essas análises, a nanoemulsão sem eugenol e revestida com uma camada de quitosana (LSS-LbL₁) também foi produzida como controle.

Primeiramente, a quitosana, nanoemulsão Eugenol-LSS, nanocápsulas LSS-LbL₁ e nanocápsulas Eugenol-LbL₁ foram analisadas por espectroscopia de energia dispersiva (TABELA 11). A contribuição do nanemulsão para a formação das nanocápsulas foi confirmada pela presença do enxofre (S), ausente na amostra de quitosana. Da mesma forma, a contribuição do polímero para a formação das nanocápsulas foi confirmada pela presença do nitrogênio (N), ausente na nanoemulsão (WALKE *et al.*, 2015).

TABELA 11 - ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DA QUITOSANA, NANOEMULSÃO Eugenol-LSS, NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EUGENOL

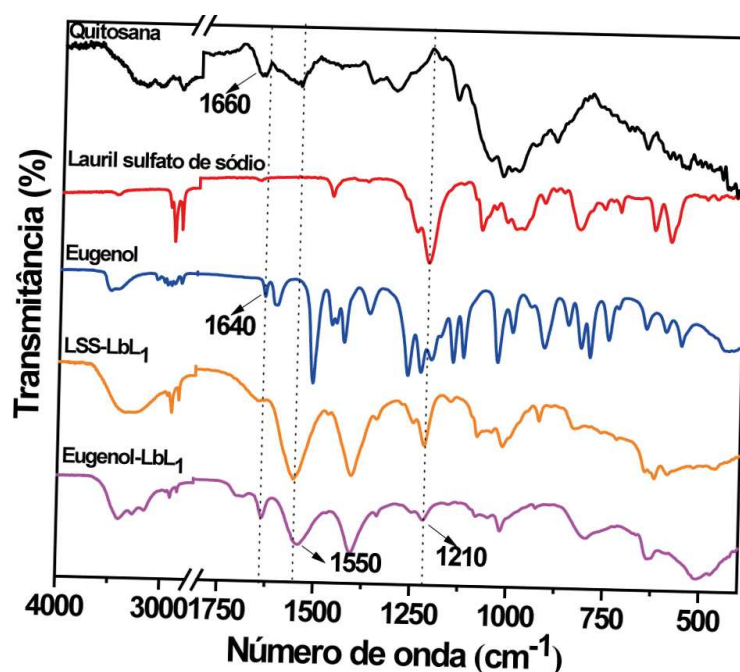
Elementos	Quitosana	Nanoemulsão Eugenol-LSS	Nanocápsulas LSS-LbL₁	Nanocápsulas Eugenol-LbL₁
C %	29,9	44,2	40,9	49,7
O %	35,5	27,6	22,7	22,1
S %	0,0	3,2	6,7	11,2
N %	0,9	0,0	0,9	1,2

FONTE: O autor (2021)

A porcentagem de carbono (C) aumentou nas nanocápsulas contendo eugenol quando comparada com as amostras na ausência de eugenol, sugerindo a contribuição do eugenol para a composição das nanocápsulas. Assim como, houve um aumento no teor de nitrogênio (N) e enxofre (S) nas nanocápsulas Eugenol-LbL₁ em relação as nanocápsulas LSS-LbL₁, possivelmente devido à interação que ocorre entre o eugenol e o surfactante para formar a nanoemulsão.

A composição química das nanocápsulas também foi avaliada usando a análise de espectroscopia na região do infravermelho. A FIGURA 31 mostra a comparação entre as nanocápsulas na presença e na ausência de eugenol. Os espectros na região do infravermelho do lauril sulfato de sódio, quitosana e eugenol também foram incluídos para comparação. No espectro da quitosana pode ser observado uma banda característica em 1660 cm^{-1} , indicando a absorção do grupo carbonil (-C=O-NHR) (DUAN *et al.*, 2004). Para as nanocápsulas de LSS-LbL₁, a banda em 1550 cm^{-1} foi atribuída à vibração da ligação N-H da quitosana (DUAN *et al.*, 2004), enquanto as bandas de aproximadamente 2900 e 1210 cm^{-1} foram atribuídas à vibração de ligação do C-H e ao alongamento assimétrico do grupo sulfato (S-O) do surfactante, respectivamente (PADALKAR *et al.*, 2009).

FIGURA 31 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A QUITOSANA, LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS), EUGENOL, NANOCÁPSULAS LSS-LbL₁ E NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₁.



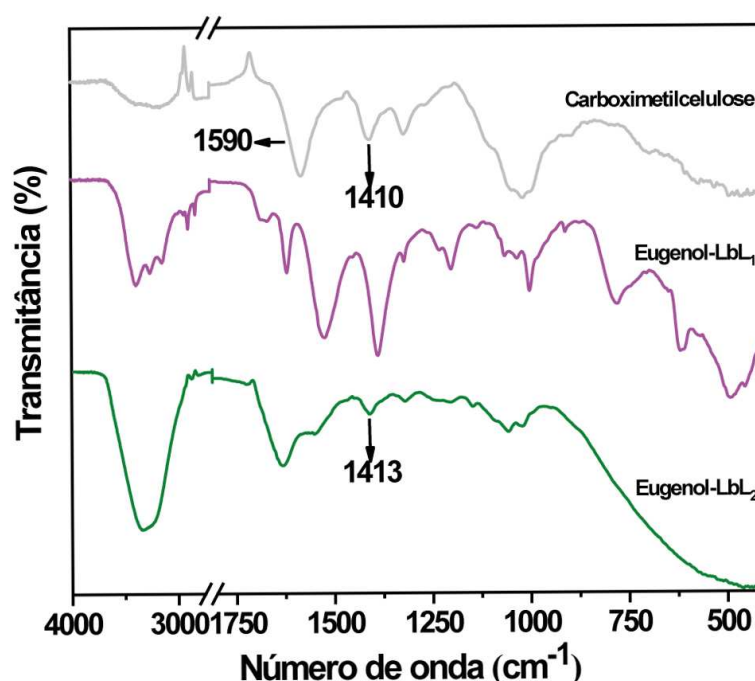
FONTE: O autor (2021)

Para as nanocápsulas Eugenol-LbL₁, foi observada a presença das mesmas bandas quando comparado às nanocápsulas de eugenol (NCs LSS-LbL₁). Portanto, a análise na região do infravermelho confirma a presença de quitosana e LSS na estrutura das nanocápsulas. Além disso, para as nanocápsulas Eugenol-LbL₁ foi observada uma banda em 1640 cm^{-1} ausente no espectro das nanocápsulas LSS-LbL₁. Essa banda pode ser atribuída ao alongamento C=C do anel aromático do

eugenol, sugerindo a presença de eugenol nas nanocápsulas Eugenol-LbL₁ (SAJOMSANG *et al.*, 2012; WORANUCH; YOKSAN, 2013). Além disso, esta análise está de acordo com a análise de espectroscopia de energia dispersiva, que também mostrou a presença de grupos químicos associados ao eugenol, lauril sulfato de sódio e quitosana para as nanocápsulas revestidas com uma camada de polímero.

Após a adição da segunda camada polimérica, o espectro na região do infravermelho das nanocápsulas Eugenol-LbL₂ (FIGURA 32) mostrou-se diferente quando comparado com os espectros obtidos para nanocápsulas Eugenol-LbL₁ e com a carboximetilcelulose pura. As bandas entre 1517-1590 cm⁻¹ e 1413 cm⁻¹ nas nanocápsulas Eugenol-LbL₂ foram atribuídas ao grupo COO⁻ da carboximetilcelulose. A presença de uma banda em 1630 cm⁻¹ pode indicar a vibração antissimétrica da deformação N-H em aminas protonadas (NH₃⁺) (OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSEWSKA-DRUZYŃSKA, 2009; CHI; CATCHMARK, 2018). Considerando que o aumento das camadas poliméricas poderia levar à sobreposição e os dados de interpretação seriam dificultados, as nanocápsulas com mais de 3 camadas não foram analisadas em estudos posteriores de espectroscopia na região do infravermelho.

FIGURA 32 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CARBOXIMETILCELULOSE; NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₁ E Eugenol-LbL₂



FONTE: O autor (2021)

O tamanho e a morfologia das cápsulas foram determinados usando análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos pela primeira técnica (TABELA 12) mostram que a nanoemulsão Eugenol-LSS possui diâmetro hidrodinâmico aparente (D_{happ}) de 96 ± 34 nm em tampão acetato de sódio. Após o revestimento, os D_{happ} aumentaram consideravelmente. Os índices de polidispersão (IPd) (TABELA 12) indicam que as amostras têm uma dispersão relativamente elevada. O aumento no tamanho médio observado com a adição de cada camada de polímero sugere que o revestimento ocorreu de forma satisfatória.

TABELA 12 - VALORES DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ}) E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPd) OBTIDOS POR DLS E DIÂMETROS MÉDIOS OBTIDOS POR MEV PARA A NANOEMULSÃO, NANO E MICROCÁPSULAS CONTENDO O EUGENOL

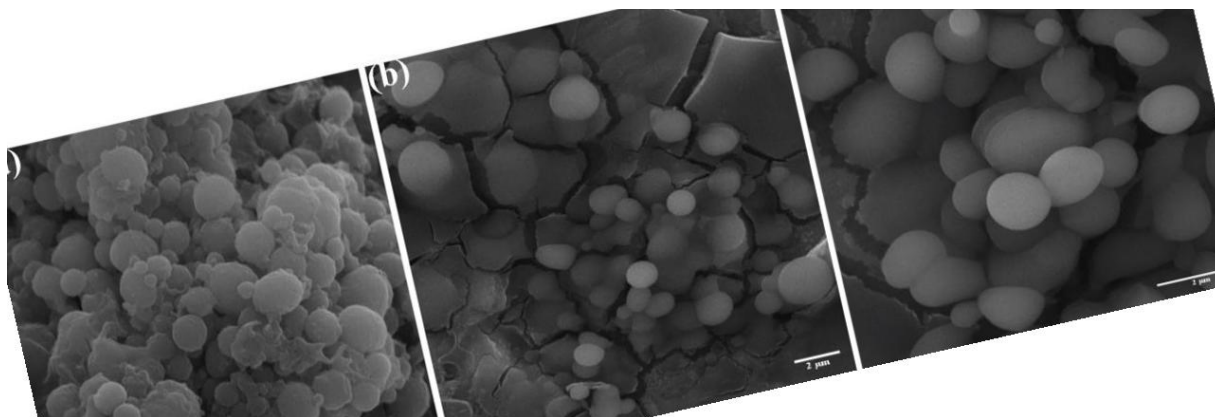
Amostras	D_{happ} (nm) \pm	IPd \pm DP	Diâmetro (nm) \pm DP
	DP		MEV
	DLS (número)		
Nanoemulsão Eugenol-LSS	$96 \pm 34^+$	-	-
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₁	$188 \pm 30^+$	$0,35 \pm 0,03$	-
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₂	$308 \pm 16^+$	$0,39 \pm 0,04$	-
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₃	$605 \pm 463^+$	$0,42 \pm 0,08$	$677 \pm 307^*$
Microcápsulas Eugenol-LbL ₄	$918 \pm 346^+$	$0,55 \pm 0,07$	$1124 \pm 482^*$
Microcápsulas Eugenol-LbL ₅	$1415 \pm 517^+$	$0,44 \pm 0,05$	$1424 \pm 387^*$

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: + n = 15 corridas de 3 min cada, * n = 50, DP = Desvio padrão.

A análise de microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 33) revelou que as cápsulas com 3 a 5 camadas de polímeros exibem uma forma esférica com distribuição de tamanho relativamente elevados (TABELA 13) corroborando com os dados obtidos por DLS. Não foi possível determinar claramente o tamanho dos nanocápsulas de uma e duas camadas de polímero, pois possivelmente as nanocápsulas entraram em colapso no momento do vácuo usado para realizar a análise.

FIGURA 33 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA PARA: (a) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₃, (b) MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL₄, E (c) MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL₅



FONTE: O autor (2021)

Juntas, as análises de potencial ζ , espectroscopia de energia dispersiva, espectroscopia na região do infravermelho, espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de varredura revelam que a produção das cápsulas contendo eugenol foi bem sucedida e que realmente ocorreu um revestimento com sucessivas camadas de polímero.

4.4.2. Estudo da formação da nanoemulsão e formação das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol

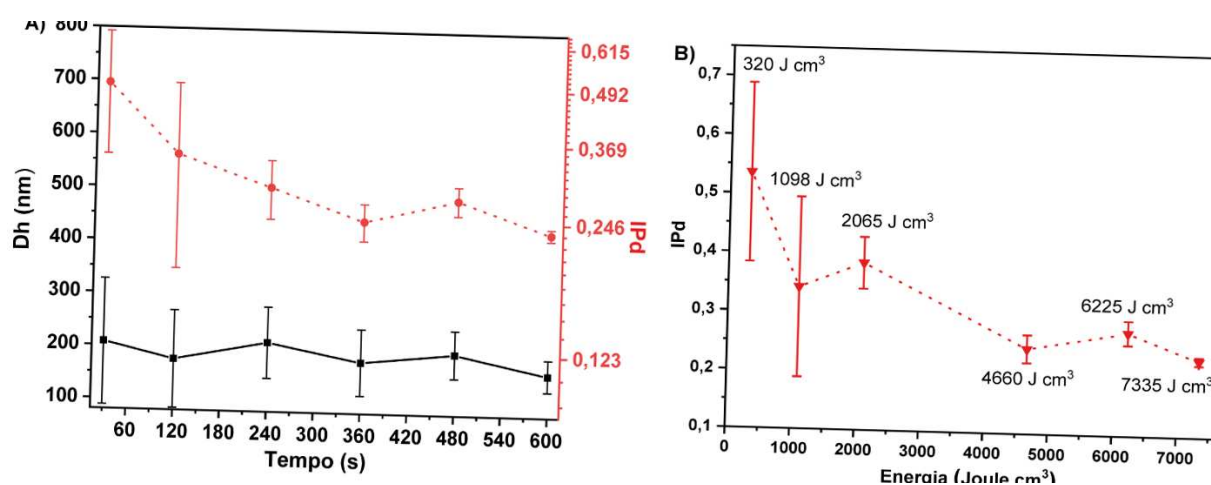
Formulação 2

A formação das nanoemulsões é uma etapa importante especialmente quando utilizadas como “*template*” para o processo de encapsulação. Portanto, nesta etapa do trabalho foi realizada a variação do tempo (30, 120, 240, 360, 480 e 600 s) de sonicação em relação a obtenção da nanoemulsão. O tamanho das gotículas e o IPd da nanoemulsão em relação ao tempo de sonicação são mostrados na FIGURA 34A.

O valor médio do D_{happ} foi calculado a partir de 5 amostras com até 20 repetições de cada medida. O IPd foi afetado pelo tempo de sonicação. Após 240 s de sonicação houve uma diminuição no tamanho das gotículas e na dispersão das amostras ($p < 0,05$). Entre 30 s (0,494) e 600 s (0,230) existiu uma diferença considerável ($p < 0,05$) no IPd, possivelmente devido à maior quantidade de energia fornecida ao sistema (FIGURA 34B). O IPd menor que 0,250 sugere uma distribuição

mais homogênea, reduzindo alguns efeitos cinéticos e contribuindo para uma nanoemulsão mais estável. Neste contexto, a melhor condição para formar gotículas mais homogêneas é sonicação por 600 s ($p < 0,05$). Uma vez que a nanoemulsão é revestida com polímero logo após a sua produção, não foram realizados testes de estabilidade ao longo do tempo para as nanoemulsões.

FIGURA 34 - (A) EFEITO DOS DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (30-600 s) SOBRE (-■-) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ}) MÉDIO E (-●-) ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPd) DA NANOEMULSÃO DE EUGENOL E (B) ENERGIA APLICADA EM RELAÇÃO AO IPd (-▼-) DA NANOEMULSÃO DE EUGENOL DETERMINADA POR DLS



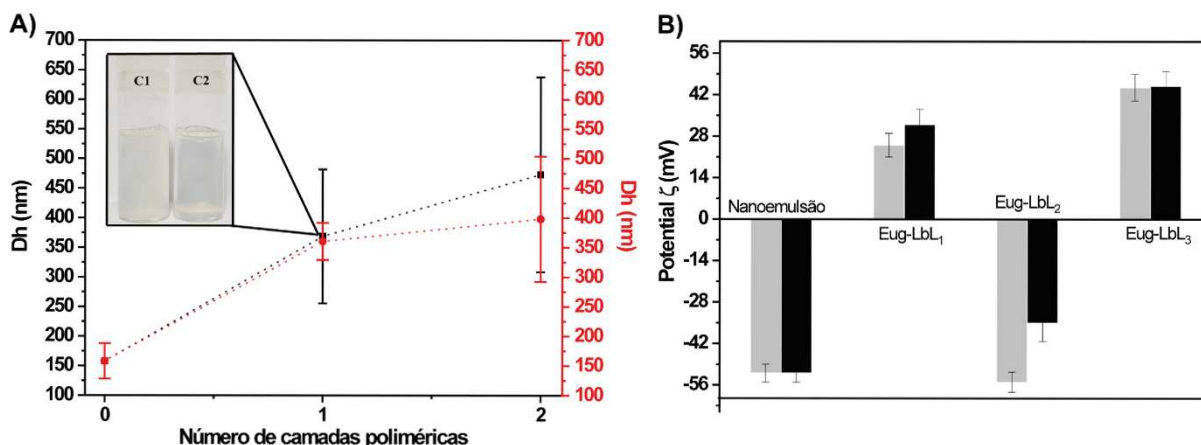
FONTE: O autor (2021)

Após a determinação da condição que resultou no menor IPd da nanoemulsão, as nanocápsulas foram obtidas por autoassociação LbL. Conforme já observado na literatura, a ordem de adição dos precursores pode alterar algumas propriedades finais das nanocápsulas, entre eles o diâmetro médio (LIU *et al.*, 2012). Para reduzir esse problema, foram seguidas duas condições diferentes de preparo das nanocápsulas. Na condição 1 (C1), a dispersão polimérica foi adicionada sobre a nanoemulsão e na condição 2 (C2), temos o oposto, a nanoemulsão foi adicionada sobre a dispersão polimérica.

Na condição C1, a dispersão de quitosana, que possui carga positiva em meio ácido ($pK_a < 6,5$), foi adicionada sobre o *template* aniônico (nanoemulsão), tornando a dispersão imediatamente leitosa. Para esta situação, o D_{happ} e o IPd (FIGURA 35A) foram de 368 ± 113 nm e 0,546, respectivamente. O valor de IPd mais elevado pode indicar a formação não uniforme das nanocápsulas. Além disso, pode ser que um

número maior de gotículas esteja sendo recoberta pela quitosana e formando estruturas maiores.

FIGURA 35 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ}) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS COM DIFERENTES NÚMERO DE CAMADA POLIMÉRICA PARA (A) CONDIÇÃO 1: DISPERSÃO POLIMÉRICA SOBRE NANOEMULSÃO (-■-) E CONDIÇÃO 2: NANOEMULSÃO SOBRE A DISPERSÃO POLIMÉRICA (-●-), (B) VARIAÇÃO DO POTENCIAL ζ EM RELAÇÃO À ORDEM DE ADIÇÃO DOS PRECURSORES PARA A CONDIÇÃO 1 (■) E CONDIÇÃO 2 (■)



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: C1: Condição 1 (polímero sobre a nanoemulsão), C2: Condição 2 (nanoemulsão sobre o polímero).

Para a condição C2, o *template* aniônico adicionado à dispersão de quitosana, a dispersão original de quitosana amarela claro tornou-se gradualmente a uma cor leitosa clara. Nessa situação, acredita-se que as gotículas sejam imediatamente revestidas com moléculas de quitosana, inibindo a agregação e aglomeração entre os nanocápsulas por meio das forças repulsivas eletrostáticas. O D_{happ} e o IPd nesta situação foram de 360 ± 30 nm e 0,390, respectivamente, menores que para C1 ($p < 0,05$). Em seguida, o tamanho e a variação do IPd foram monitorados para as demais camadas autoassociadas das nanocápsulas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no D_{happ} e no IPd para a ordem de adição dos precursores ($p > 0,05$). Os valores obtidos foram D_{happ} : 473 ± 164 nm e IPd: 0,440 para a condição 1 e D_{happ} : 398 ± 106 nm e IPd: 0,396 para a condição 2.

Além do tamanho das nanocápsulas, a estabilidade por potencial ζ foi observada após cada revestimento para C1 e C2. Na FIGURA 35B é possível observar a inversão do potencial no plano de cisalhamento para cada deposição polimérica e inferir que independente da ordem de adição dos precursores, as nanocápsulas

encontram-se na região de estabilidade ($>|30|$ mV). Assim, para experimentos posteriores tanto com o eugenol com o linalol e 1-decanol, foi utilizada a condição C2.

Após a otimização da obtenção das nanocápsulas, foi realizada a determinação da perda de massa (%) em função da temperatura por análise termogravimétrica (TGA). As curvas termogravimétricas do eugenol, uma mistura de quitosana-carboximetilcelulose e as nanocápsulas Eug-LbL₁₋₂ são apresentadas na FIGURA 36 e na TABELA 13.

Para o eugenol, foi observada uma fase de volatilização com perda de massa (97,4%) entre 60 e 260 °C (T_{pico} : 170 °C), com T_{pico} um pouco abaixo do que relatado em literatura (T_{pico} : 195 °C) (SHAO, *et al.* 2018) indicando que é um composto que não pode ser processado em altas temperaturas. As perdas de massa da mistura de quitosana-carboximetilcelulose e das nanocápsulas Eug-LbL₁₋₂ abaixo de 100 °C foram de 15,0% e 8,0%, respectivamente, devido à vaporização da umidade residual presente nas amostras. O segundo estágio de perda de massa para a mistura de quitosana-carboximetilcelulose (44,5%) ocorreu entre 97 e 264 °C (T_{pico} : 208 °C) e pode ser atribuído à despolimerização e decomposição da unidade glucosamina da quitosana.

O terceiro estágio entre 303 a 380 °C (T_{pico} : 350 °C) com perda de massa de 19,8% pode estar relacionado à decomposição do grupo hidroxila da carboximetilcelulose (YUE *et al.*, 2019). No caso das nanocápsulas Eug-LbL₁₋₂, a perda de massa de aproximadamente 10,0% entre 100-180 °C (T_{pico} : ~145 °C) pode ser devido à presença de eugenol na superfície dos nanocápsulas, por não ter sido encapsulado ou ter sido liberado do interior das nanocápsulas. No estágio seguinte, a perda de massa (68,8%) na faixa entre 180 e 325 °C (T_{pico} : ~230 °C) pode ser atribuída à decomposição térmica da estrutura da quitosana, carboximetilcelulose e eugenol encapsulado (WORANUCH; YOKSAN, 2013), como observado por Hu e colaboradores (2018) ao atribuir a faixa de perda de massa entre 160 a 460 °C para a decomposição térmica da quitosana e compostos aromáticos encapsulados. Por fim, o quarto estágio entre 325-600 °C pode estar relacionado a decomposição de ambos os polímeros (ZHANG; ZHAO, 2015; YUE *et al.*, 2019).

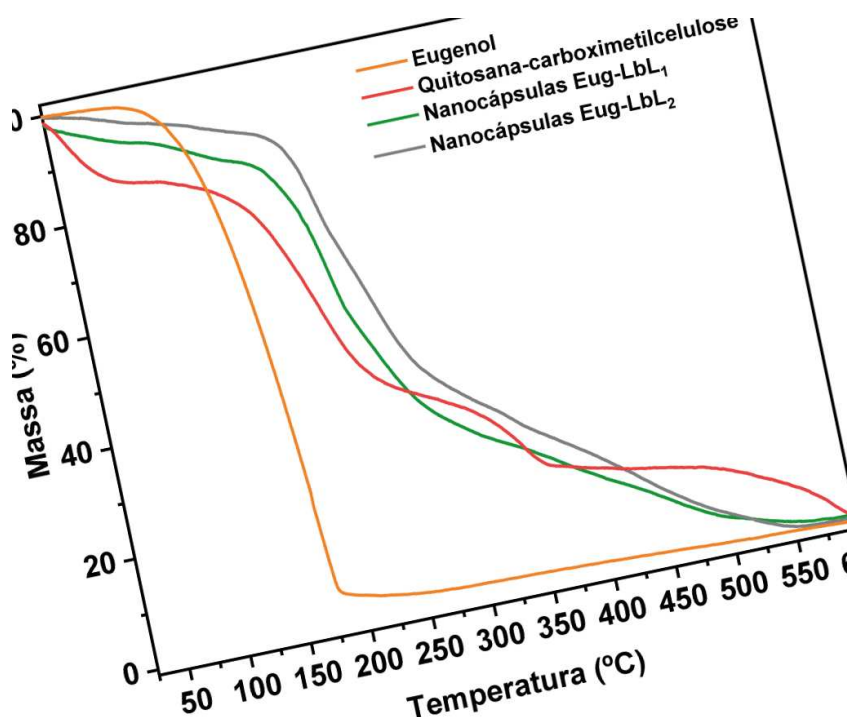
TABELA 13 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O EUGENOL, MISTURA QUITOSANA+CARBOXIMETILCELULOSE E NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL (Eug-LbL₁₋₂) A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

	Primeiro estágio				Segundo estágio				Terceiro estágio				Quarto estágio			
	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa
	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)
Eugenol	170	60	260	97,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quitosana+carboximetilcelulose	45	25	90	15,0	208	97	264	44,5	350	303	380	19,8	480	370	600	18,0
Nanocápsulas Eug-LbL₁	60	45	83	8,0	145	100	180	10,5	230	180	325	68,8	345	325	380	11,0
Nanocápsulas Eug-LbL₂	75	45	95	8,0	150	118	170	9,4	228	176	304	55,4	345	325	380	25,0

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: T_i – Temperatura inicial; T_f – Temperatura final; T_p – Temperatura de pico

FIGURA 36 - TERMOGRAMAS DO EUGENOL, MISTURA DE QUITOSANA-CARBOXIMETILCELULOSE E NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁₋₂ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO



FONTE: O autor (2021)

4.4.3. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol ou 1-decanol

Formulações 3 e 4

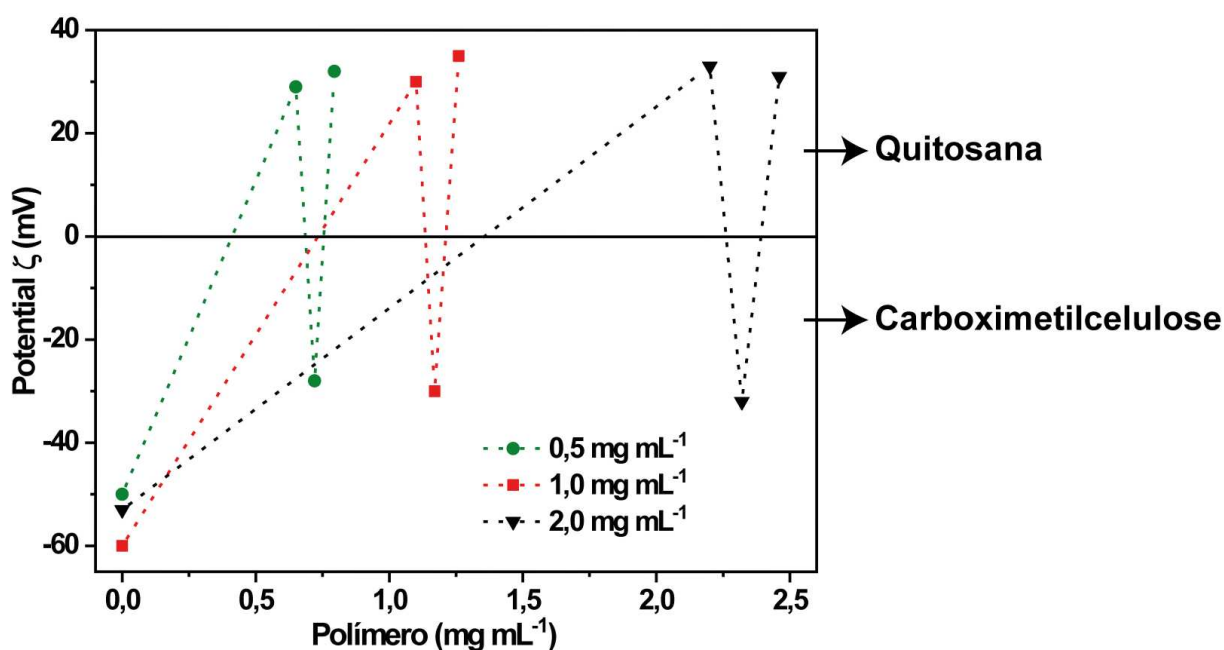
Para o desenvolvimento das formulações contendo linalol e 1-decanol, inicialmente foram realizados testes com dispersões de quitosana e carboximetilcelulose em diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹). Para monitorar a melhor condição, nanocápsulas mais homogêneas e com maior eficiência de incorporação, foi utilizada a técnica de potencial ζ , em que alíquotas das dispersões de quitosana e carboximetilcelulose foram adicionadas sobre a nanoemulsão (100 μ L a cada 100 s). A FIGURA 37 mostra os valores de potencial ζ em relação a deposição dos polímeros sobre a nanoemulsão.

É possível observar que com a menor quantidade em massa de polímero ocorre uma melhor interação com a superfície aniônica das gotículas, promovendo um recobrimento polimérico com valores de estabilidade adequados (30 mV). Também se observa que para a concentração de 0,5 mg mL⁻¹ as subsequentes inversões de potencial com adição de carboximetilcelulose e quitosana, utilizam uma menor

quantidade de polímero quando comparadas com as concentrações mais altas. Isso pode estar relacionado aos grupos iônicos estarem mais expostos em concentrações mais baixas, pois em concentrações mais altas os polímeros podem estar em uma condição de maior entrelaçamento das cadeias, ou seja, uma maior interação polímero-polímero (COSGROVE, 2005). Neste sentido, a menor concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ consegue promover uma estabilização iônica das gotículas e das nanocápsulas, possivelmente devido a um efeito sinérgico pronunciado entre surfactante e polieletrólito e no caso das nanocápsulas entre os polieletrólitos.

Em dispersões poliméricas com baixas concentrações as moléculas em média, dependendo da força iônica e pH do meio, estão separadas diminuindo suas interações mútuas. Por outro lado, em altas concentrações as moléculas podem se associar devido à grande quantidade de grupos hidroxila ou amino, que facilmente podem promover ligações de hidrogênio (CHIAPPISI; GRADZIELSKI, 2015). Assim, é possível que em altas concentrações, que agregados poliméricos, e não polímeros, estejam adsorvidos às interfaces.

FIGURA 37 - VARIAÇÃO DO POTENCIAL ζ EM RELAÇÃO ÀS DISPERSÕES DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, $0,5$; $1,0$ e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$

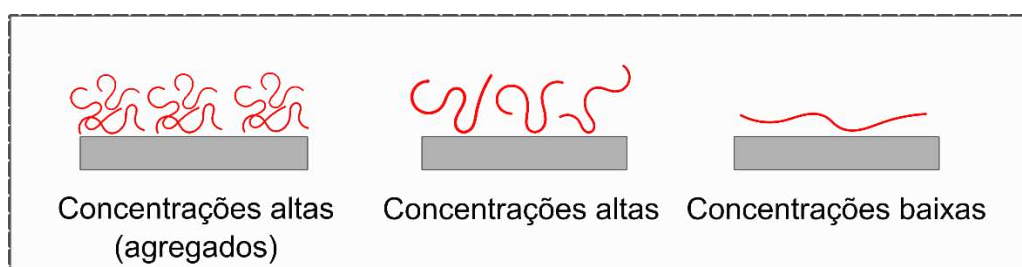


FONTE: O autor (2021)

Em sua pesquisa Voigt e colaboradores (2003), propuseram um modelo de conformação que os polieletrólitos podem assumir dependendo da concentração em

que se encontram. Este esquema pode ser observado na FIGURA 38 e indica que em altas concentrações, as cadeias dos polieletrólitos interagem com a interface do substrato, mas apenas em alguns sítios, o que resulta em interações curtas e caudas longas, orientados para a dispersão. Por outro lado, em baixas concentrações, o polímero encontrará muitos locais de ligação, proporcionando uma conformação mais plana. Dessa forma, indica-se que a concentração das dispersões dos polissacarídeos pode influenciar na construção e na espessura de multicamadas tanto de filmes como nanocápsulas.

FIGURA 38 – MODELO DE CONFORMAÇÃO QUE OS POLIELETRÓLITOS PODEM ASSUMIR EM ALTAS OU BAIXAS CONCENTRAÇÕES EM RELAÇÃO A UM SUBSTRATO



FONTE: Adaptado de Voigt *et al.* (2003).

Para avaliar a deposição das camadas de polímeros foi utilizada a técnica de microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D). Basicamente essa técnica mede pequenas variações de massa (adição ou remoção) por unidade de área por meio da mudança nos valores de frequência de ressonância de um cristal piezoelétrico. Além disso, pode ser monitorada a alteração dos valores de dissipação do cristal que poderá fornecer propriedades estruturais (viscoelásticas) das camadas adsorvidas sobre a superfície do cristal de quartzo.

A FIGURA 39 apresenta a variação de frequência, massa e dissipação ao longo da deposição das camadas de polímeros. A análise foi iniciada com o cristal de quartzo modificado previamente com L-cisteína, glutaraldeído e uma camada de quitosana. Essa metodologia já foi utilizada por Triyana e colaboradores (2018), para monitorar vapores de álcoois em tempo real, uma vez que esse vapores em concentrações elevadas são prejudiciais à saúde.

A L-cisteína contém três átomos de carbono com grupos funcionais diferentes (-SH, -OOH e -NH₂), como o cristal de quartzo possui uma camada fina de ouro, por meio do grupo -SH, a L-cisteína se adsorve espontaneamente nesse substrato. A

modificação com glutaraldeído e com quitosana ocorre por reticulação via adição nucleofílica da amina da L-cisteína e da quitosana à carbonila do glutaraldeído.

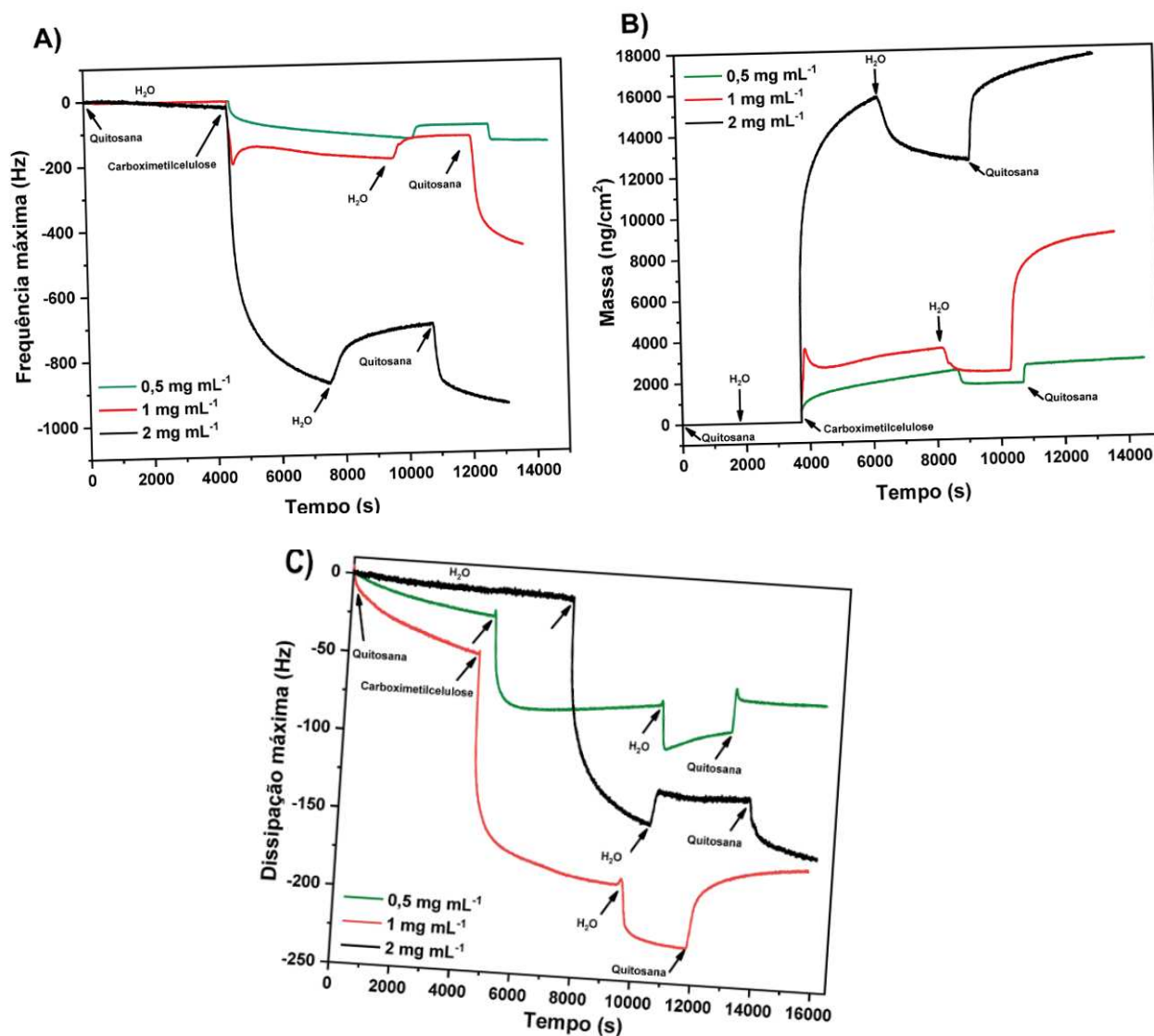
Na FIGURA 39A é possível observar que quando o cristal modificado entra em contato com a dispersão de carboximetilcelulose o sinal de frequência sofre uma queda, associado à adsorção da carboximetilcelulose na superfície do cristal (camada de quitosana com carga superficial positiva). Em seguida, foi realizada a lavagem com água purificada e observado um aumento do sinal de frequência sugerindo a remoção de material que não foi adsorvido no cristal ou adsorvido fracamente. Ao adicionar quitosana novamente, foi observado um comportamento semelhante com a diminuição do sinal de frequência resultando na adsorção da quitosana sobre o filme de carboximetilcelulose.

A FIGURA 39B mostra a massa adsorvida sobre o cristal modificado em cada etapa de formação das camadas. Observa-se um aumento de massa quando a dispersão de carboximetilcelulose entra em contato com o cristal modificado com quitosana, esse aumento de massa é mais pronunciado em relação a dispersão de carboximetilcelulose na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Quando iniciado o processo de lavagem há uma redução da massa, devido à retirada das moléculas que não adsorveram ou adsorveram fracamente sobre a superfície da quitosana. Na última etapa, a quitosana entra em contato com o cristal modificado com carboximetilcelulose e há novamente um aumento de massa, indicando a sua interação com a carboximetilcelulose. Foi possível observar que as três concentrações testadas diferem entre si, há uma adsorção maior em concentrações maiores. No entanto, há a formação de filmes para todas as concentrações testadas. A maior quantidade de massa adsorvida pela dispersão de carboximetilcelulose a $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ pode estar relacionada com a amostra estar mais próxima do regime semidiluído causando maior interações polímero-polímero do que polímero-solvente. E quando entra em contato com a superfície modificada por quitosana interage com poucos sítios do polímero e orienta suas caudas para a dispersão para interagir com outras moléculas de carboximetilcelulose presentes na dispersão.

Na FIGURA 39C encontra-se a análise de dissipação de energia em relação ao tempo (s). Com a adsorção de carboximetilcelulose sobre o filme de quitosana, observa-se a redução da dissipação, indicando a formação de um filme rígido. A adição posterior de quitosana não afeta, significativamente, a elasticidade do sistema,

demonstrando que as multicamadas formadas se apresentam rigidamente depositadas na interface (HÖÖK *et al.*, 2001).

FIGURA 39 - VARIAÇÃO NOS VALORES DE (A) FREQUÊNCIA, (B) MASSA, (C) DISSIPAÇÃO DURANTE A DEPOSIÇÃO DE CAMADAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE (ν : 3)



FONTE: O autor (2021)

Para confirmar a modificação dos cristais piezoelétricos foram realizadas análises de ângulo de contato com o líquido água para cada amostra. Os valores de ângulo de contato obtidos encontram-se na TABELA 14. O ângulo de contato para o cristal modificado com L-cisteína e glutaraldeído foi bem inferior ao observado para o cristal de quartzo limpo confirmando que houve uma modificação da sua superfície. O

mesmo pode ser observado para os cristais modificados com as dispersões de quitosana e carboximetilcelulose.

TABELA 14 - ÂNGULO DE CONTATO DOS CISTAIS DE QUARTZO MODIFICADOS COM O LÍQUIDO ÁGUA

Amostras	Ângulos de contato / °
Cristal Quartzo - Ouro	84 ± 3
L-cisteína + glutaraldeído	65 ± 5
Quitosana 0,5 mg mL ⁻¹	43 ± 1
Caboximetilcelulose 0,5 mg mL ⁻¹	30 ± 2
Quitosana 1 mg mL ⁻¹	54 ± 2
Caboximetilcelulose 1,0 mg mL ⁻¹	39 ± 4
Quitosana 2 mg mL ⁻¹	54 ± 7
Caboximetilcelulose 2,0 mg mL ⁻¹	50 ± 3

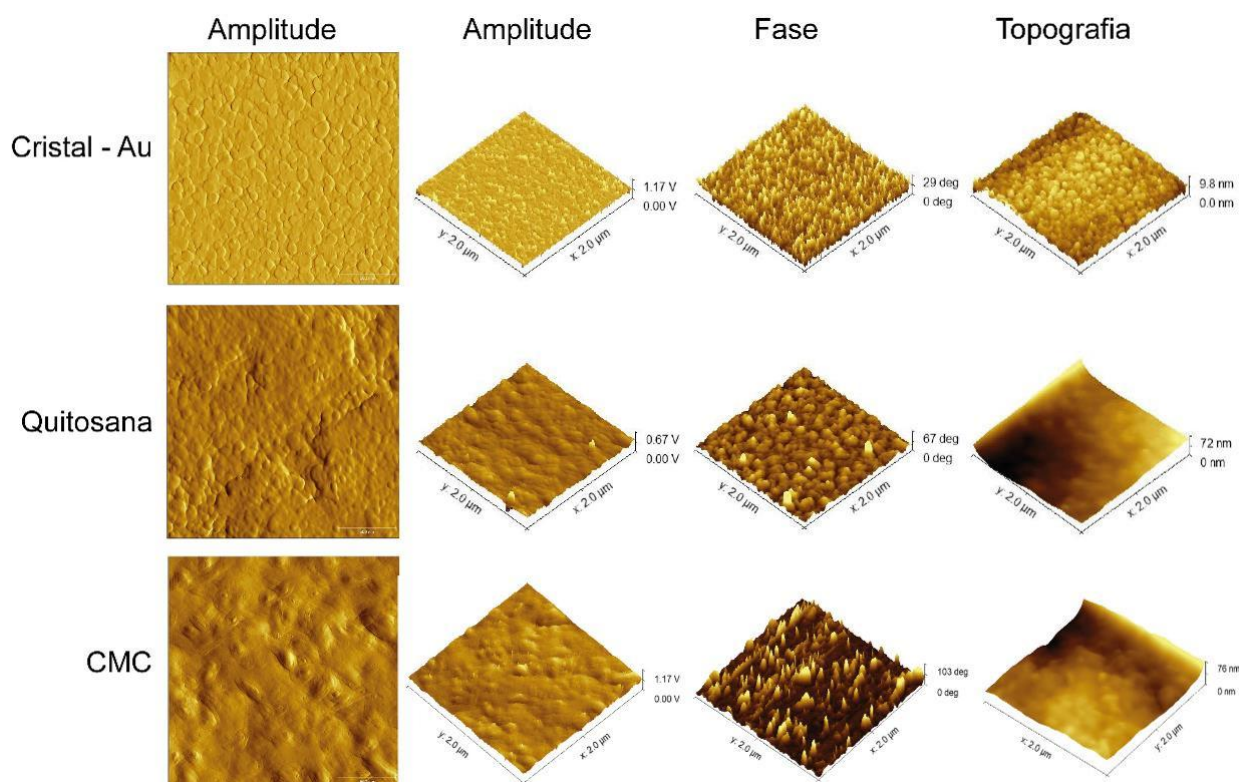
FONTE: O autor (2021)

A fim de analisar a morfologia da formação dos filmes sobre os cristais foi utilizada a microscopia de força atômica. As imagens presentes na FIGURA 40 são referentes aos cristais de quartzo não modificados e modificados com dispersões de quitosana e carboximetilcelulose na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. É possível observar que a morfologia superficial foi influenciada pela deposição das camadas poliméricas, modificando a amplitude, fase e topografia. Com relação às camadas de polímero, as imagens mostraram apenas pequenas mudanças, indicando assim camadas de adsorção bastante finas e uniformes. Portanto, essas técnicas contribuíram de forma eficiente para melhor entender os sistemas estudados e dar prosseguimento ao trabalho.

Levando em consideração que as nanocápsulas poderiam ser formadas com uma menor quantidade de massa de polímero decidiu-se por dar prosseguimento nos estudos utilizando as dispersões de quitosana e carboximetilcelulose na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Em experimentos anteriores, foi observado que, na modificação do potencial ζ , soluções coloidais de quitosana foram mais eficientes em inverter o potencial de superfície no plano de cisalhamento, corroborando com a sugestão de uso de menores concentrações de quitosana. Além disso, o preparo das nanoemulsões e das nanocápsulas por autoassociação LbL seguiram os mesmos

protocolos referentes à produção da Formulação 2, uso de 10 min de sonicação e adição da nanoemulsão sobre a dispersão polimérica.

FIGURA 40 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA O CRISTAL DE QUARTZO, DISPERSÃO DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) NA CONCENTRAÇÃO DE 0,5 mg mL⁻¹. ÁREA DE VARREDURA DE 2 X 2 μ m



FONTE: O autor (2021)

Nesta etapa, foram obtidas nanocápsulas de linalol e nanocápsulas de 1-decanol utilizando a metodologia de autoassociação LbL. Os valores de D_{happ} e potencial ζ estão sumarizados na TABELA 15. Os valores de potencial de superfície no plano de cisalhamento indicam que as amostras estão acima de uma região de estabilidade, para ambas as formulações. Além disso, observa-se a inversão de potencial de superfície à medida que dispersões poliméricas catiônicas ou aniônicas são adicionadas à nanoemulsão. O D_{happ} das amostras situou-se na faixa de 188 a 339 nm. Diante disso, as duas técnicas confirmam a formação das nanocápsulas.

Após a confirmação da formação das nanocápsulas pelas técnicas de DLS e potencial ζ , foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho e termogravimétricas das amostras. Na FIGURA A6 (Apêndice) encontram-se os espectros na região do infravermelho para as amostras contendo linalol e 1-decanol,

embora os espectros confirmem a formação das nanocápsulas, não foram observadas diferenças consideráveis. A FIGURA 41 e a TABELA 16 mostram as perdas de massa para o linalol, nanocápsulas na ausência (LbL₁₋₂ vazias) e na presença de linalol (Lin-LbL₁₋₂), 1-decanol e nanocápsulas na presença de 1-decanol (1Dec-LbL₁₋₂) em função da temperatura, além disso do lado direito da imagem pode ser observada a primeira derivada da variação da massa em função da temperatura.

TABELA 15 - VALORES DE POTENCIAL ζ E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ}) MÉDIO PARA AS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS DE LINALOL E 1-DECANOL

Amostras	Linalol		1-Decanol	
	Potencial ζ (mV)	DLS (nm)	Potencial ζ (mV)	DLS (nm)
	\pm DP	\pm DP	\pm DP	\pm DP
Nanoemulsão	-45,2 \pm 2,0	-	-51,0 \pm 1,2	-
Nanocápsula LbL ₁	57,2 \pm 2,9	188 \pm 48	59,1 \pm 1,7	192 \pm 60
Nanocápsula LbL ₂	-55,9 \pm 1,6	256 \pm 52	-38,3 \pm 2,1	339 \pm 188

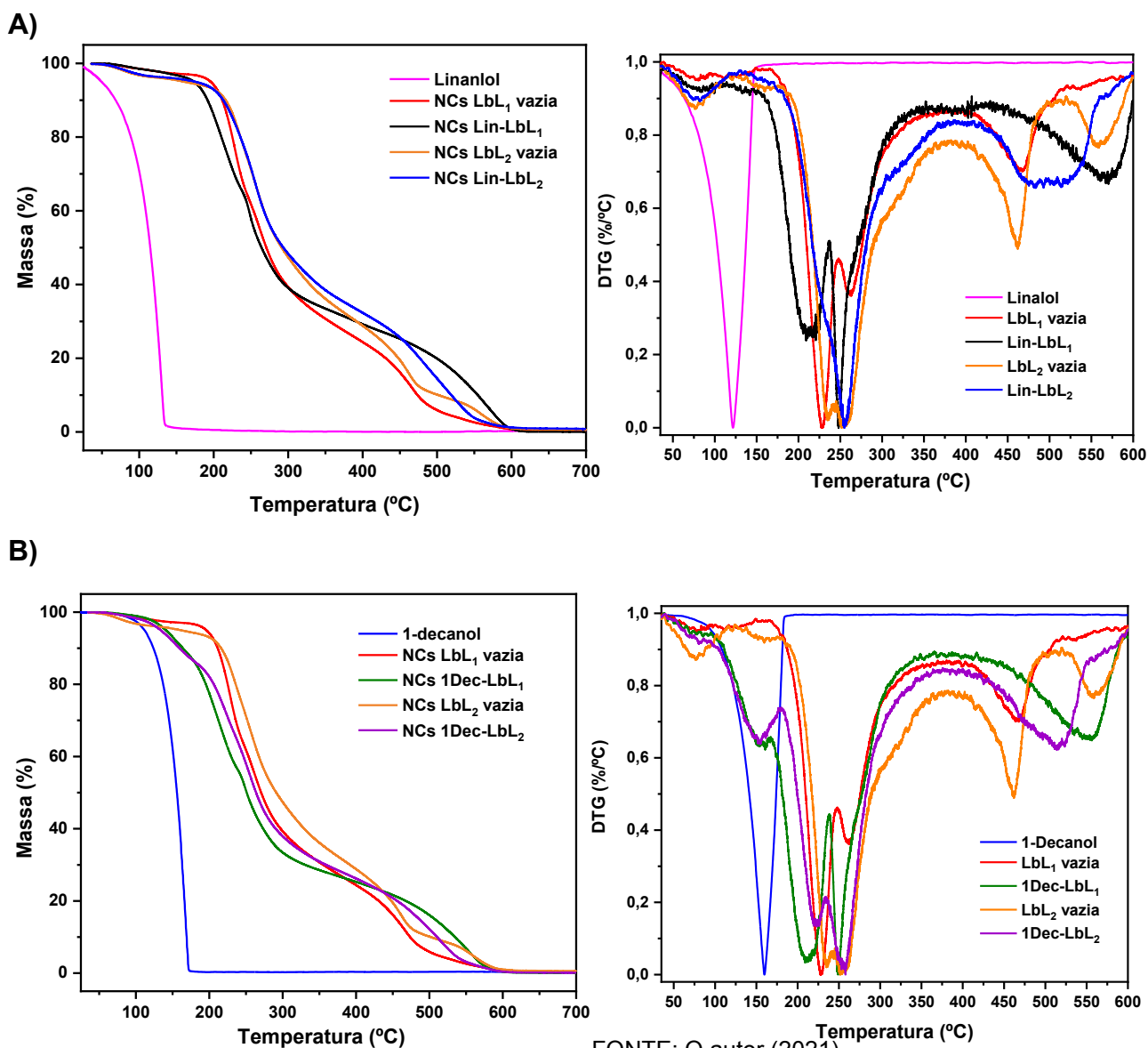
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: DP = Desvio padrão.

No primeiro estágio, as perdas de massa de 98% entre 35 e 150 °C (T_{pico} : 120 °C) para o linalol e 62 e 183 °C (T_{pico} : 160 °C) para o 1-decanol são relativas à volatilização das moléculas, indicando que são compostos instáveis à altas temperaturas. Em relação às nanocápsulas tanto na ausência como na presença dos ativos, a perda de massa (4-5%) na faixa de 35 a 120 °C pode ser atribuída à evaporação de umidade presente nas amostras. Entre 100 e 176 °C (T_{pico} : 154 °C) observa-se a perda de massa apenas para as nanocápsulas contendo 1-decanol, possivelmente devido ao ativo adsorvido na superfície das nanocápsulas. O terceiro e quarto estágios de perdas de massa para as nanocápsulas na ausência dos ativos podem estar relacionados à despolimerização e decomposição da unidade glucosamina da quitosana e à decomposição do grupo hidroxila da carboximetilcelulose (WORANUCH; YOKSAN, 2013; YUE *et al.*, 2019). No caso das nanocápsulas contendo os ativos, a faixa entre 150 e 340 °C pode ser atribuída à decomposição térmica da estrutura da quitosana, carboximetilcelulose e dos ativos encapsulados (XIAO *et al.*, 2017). Por fim, o último estágio pode estar relacionado a decomposição da unidade de glucosamina da quitosana e à decomposição da estrutura da carboximetilcelulose (XIAO *et al.*, 2017; YUE *et al.*, 2019). A quantidade

de polímero remanescente entre 400 e 600 °C para todas as nanocápsulas pode indicar que essas formulações são termoestáveis (ZHANG; ZHAO, 2015).

FIGURA 41 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA PARA O (A) LINALOL, NANOCÁPSULAS LbL₁₋₂ vazias E NANOCÁPSULAS Lin-LbL₁₋₂, (B) 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS LbL₁₋₂ vazias E NANOCÁPSULAS 1Dec-LbL₁₋₂ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO



FONTE: O autor (2021)

TABELA 16 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE CONTENDO LINALOL OU 1-DECANOL E NANOCÁPSULAS QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS EM ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

	Primeiro estágio				Segundo estágio				Terceiro estágio				Quarto estágio				Quinto estágio			
	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa	T_p	T_i	T_f	massa
	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)	(°C)	(°C)	(°C)	(%)
Linalol	120	35	150	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCs Lin-LbL₁	80	35	100	4	-	-	-	-	210	150	240	29	246	240	350	28	570	440	630	33
NCs Lin-LbL₂	80	35	120	5	-	-	-	-	250	140	380	60	-	-	-	-	500	410	600	34
NCs LbL₁ vazia	77	40	110	4	-	-	-	-	230	170	240	31	260	250	340	35	460	410	520	30
NCs LbL₂ vazia	77	40	110	5	-	-	-	-	250	180	360	30	460	400	510	36	560	520	625	20
1-Decanol	160	62	183	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCs 1Dec-LbL₁	77	40	95	4	154	100	170	12	210	170	238	28	252	240	340	33	550	440	580	22
NCs 1Dec-LbL₂	77	40	95	4	154	100	176	12	220	180	240	35	255	245	350	24	510	410	580	24

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: T_i – Temperatura inicial; T_f – Temperatura final; T_p – Temperatura de pico.

Embora tenha sido desenvolvida uma metodologia simples de preparo das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose existem fatores limitantes para esses materiais que é a caso da durabilidade no meio ambiente, já que são polímeros obtidos de fontes naturais. Em paralelo, e a título de comparação, foi proposto o preparo de nanocápsulas com um material, embora natural, com maior durabilidade no meio ambiente, nesse caso o polímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Diante disso, foram preparadas nanocápsulas de PHBV contendo os materiais de núcleo eugenol, linalol e 1-decanol.

4.4.4. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol

Formulação 5 - Inicialmente, foram preparadas nanocápsulas de PHBV contendo o eugenol. As variáveis como concentração do polímero, massa do ativo e velocidade de homogeneização estão entre os inúmeros fatores que podem afetar a obtenção de nanocápsulas. Nesse sentido, essas variáveis foram avaliadas em um delineamento experimental. Na TABELA 17 encontra-se a matriz de ensaios codificada e os valores das respostas obtidas para o diâmetro hidrodinâmico aparente (D_{happ} nm) médio, eficiência de incorporação (EI%) e índice de polidispersão (IPd) das nanocápsulas de PHBV contendo eugenol.

Para determinar a EI% as amostras foram analisadas no intervalo de varredura de 230-350 nm utilizando a espectroscopia na região do UV-Vis. Além das amostras contendo eugenol (NCs Eug-PHBV), foram analisadas as nanocápsulas na ausência de eugenol (NCs PHBV vazias). Para o cálculo da EI%, foi subtraída a absorbância das NCs PHBV vazias e para a determinação do D_{happ} e IPd foi utilizada a análise de DLS, sendo que para cada experimento foram realizadas a avaliação de 5 amostras com até 20 repetições de 5 min.

Após as determinações da EI%, D_{happ} e IPd, foram realizadas as análises estatísticas. A TABELA 18 e a FIGURA 42 apresentam a análise de variância e o Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para EI% das nanocápsulas.

TABELA 17 - RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%), DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ} / nm) MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (IPd) PARA OS FATORES X1, X2 E X3

Variável				Resposta		
Experimentos	X1	X2	X3	EI / % \pm DP	D_{happ} / nm \pm DP	IPd \pm DP
NCs PHBV vazias	NA	NA	NA	NA	82 \pm 6	0,197 \pm 0,01
1	-	-	-	18,4 \pm 1,4	118 \pm 22	0,253 \pm 0,01
2	+	-	-	17,3 \pm 4,3	153 \pm 5	0,265 \pm 0,02
3	-	+	-	30,9 \pm 2,3	127 \pm 17	0,293 \pm 0,02
4	+	+	-	29,0 \pm 3,6	136 \pm 12	0,281 \pm 0,01
5	-	-	+	8,5 \pm 0,7	126 \pm 27	0,272 \pm 0,01
6	+	-	+	6,7 \pm 0,4	132 \pm 10	0,260 \pm 0,01
7	-	+	+	10,3 \pm 2,2	136 \pm 17	0,283 \pm 0,01
8	+	+	+	6,8 \pm 1,8	151 \pm 23	0,242 \pm 0,01
9	0	0	0	11,0 \pm 0,6	130 \pm 14	0,270 \pm 0,03
10	0	0	0	10,1 \pm 1,6	127 \pm 15	0,270 \pm 0,01
11	0	0	0	10,8 \pm 1,3	126 \pm 22	0,275 \pm 0,01

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: NA - não se aplica. Os dados são apresentados com a média \pm desvio padrão (DP) (n = 3). X1: Concentração do PHBV (mg L⁻¹). X2: Velocidade de homogeneização (rpm). X3: Massa de eugenol (mg). DP = Desvio padrão.

Para a análise de variância observa-se que o valor de F calculado é superior ao de F tabelado. Dessa forma, a variação dos parâmetros apresenta interferência na resposta da EI% dos ativos nas nanocápsulas.

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%) DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p
Regressão	732,6	8	91,6	410,1	19,4	0,002
Resíduo	0,5	2	0,2			
Total	733,1	10		R ² =99,7%		

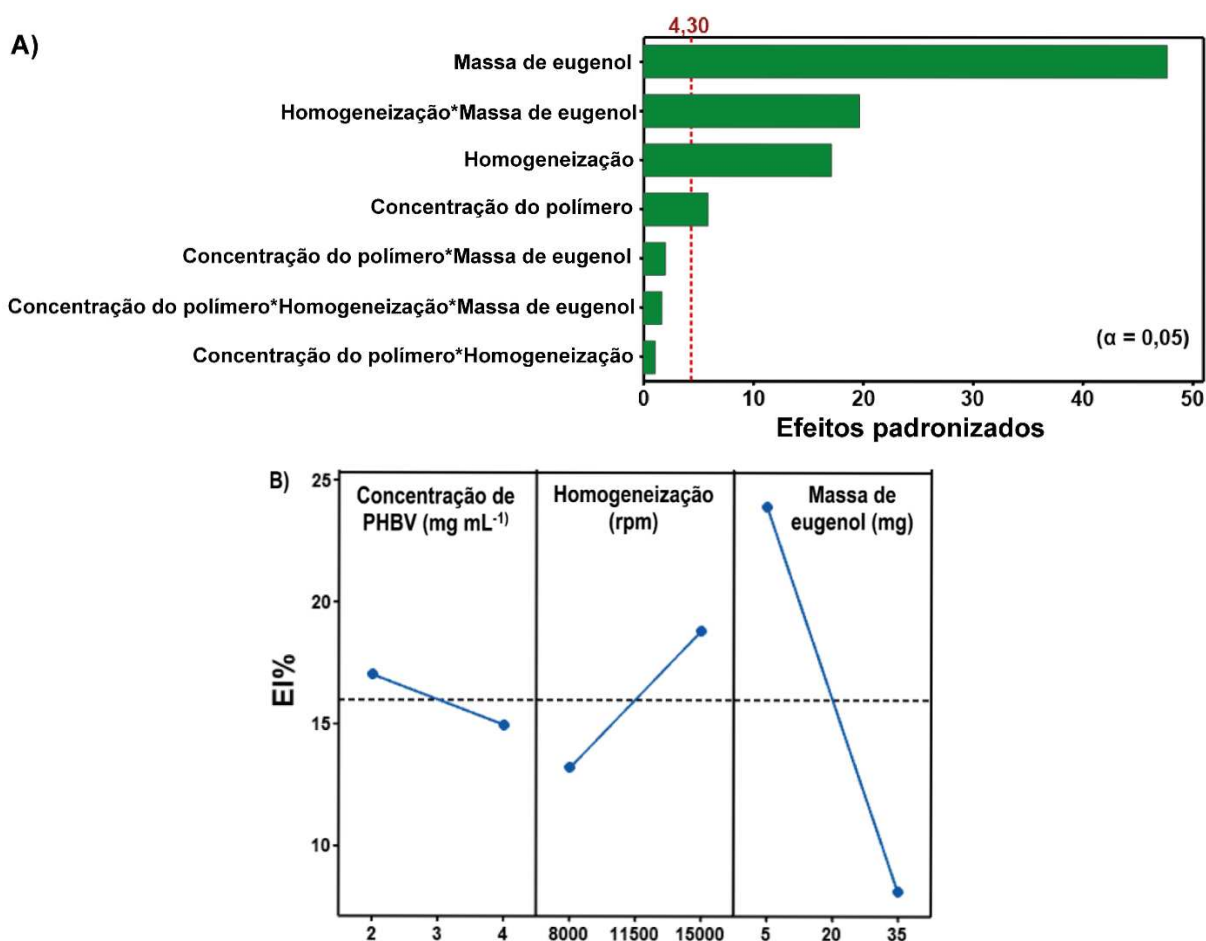
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{calc}: F calculado; F_{tab}: F tabelado; R²: coeficiente de determinação.

O Diagrama de Pareto (FIGURA 42A) mostra desde os efeitos mais pronunciados até os menores efeitos. Neste caso, é possível observar que a massa de eugenol, a homogeneização e a concentração do polímero, assim como a interação

velocidade de homogeneização e a massa de eugenol apresentam efeitos significativos em relação a EI%. Além disso, ao observar os efeitos principais (FIGURA 42B) percebe-se que maiores concentrações de polímero e massa de eugenol há um decréscimo na EI%. Para as diferentes concentrações de polímero os valores de EI% são muito próximos e no final do experimento se observava uma sobra de polímero, possivelmente que não reagiu para formar as nanocápsulas. No caso da massa de eugenol, a menor EI% com maiores massas pode estar relacionada à saturação das nanocápsulas com o ativo. Por outro lado, ao aumentar a velocidade de homogeneização há um aumento na EI%, provavelmente porque há o favorecimento do início da precipitação do polímero sobre as nanogotas e, portanto, o ativo demora mais tempo para se difundir de dentro das nanocápsulas para o meio.

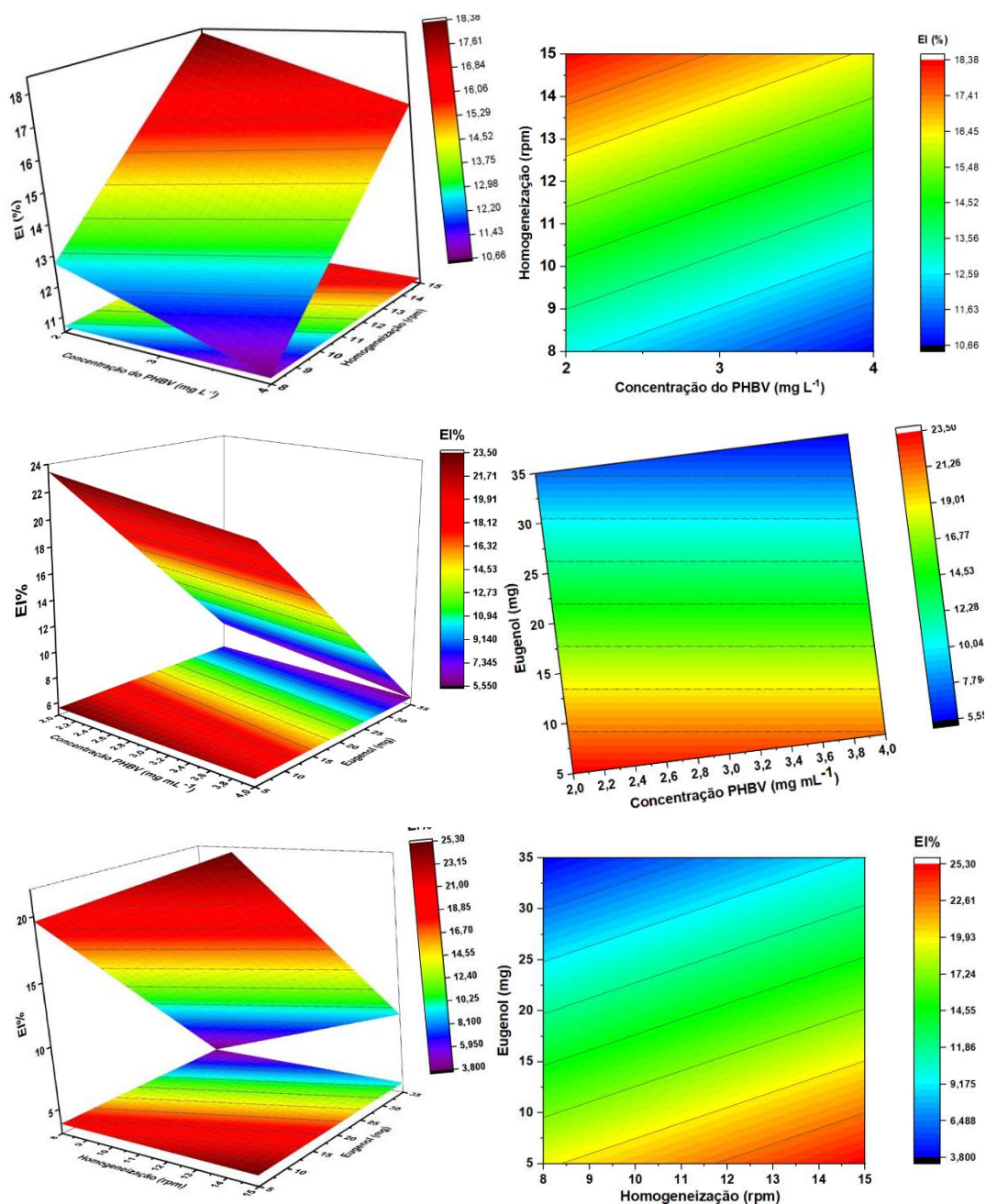
FIGURA 42 - (A) DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS E (B) EFEITOS PRINCIPAIS PARA A EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (EI%) DO EUGENOL NAS NANOCÁPSULAS



FONTE: O autor (2021)

As superfícies de resposta e as curvas de contorno da FIGURA 43 apontam para valores máximos de EI% do eugenol nas nanocápsulas nos níveis inferiores das variáveis de concentração de polímero e massa de eugenol e nível superior de homogeneização, corroborando com os dados observados pelos efeitos principais.

FIGURA 43 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTOURNO PARA A VARIAÇÃO DA HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL^{-1}) (A) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL^{-1}) (B) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) (C) EM RELAÇÃO A EFICIÊNCIA DE INCOPORAÇÃO (%)



FONTE: O autor (2021)

Entretanto, em relação a concentração do polímero, os dados do presente trabalho divergem da literatura, embora sejam sistemas com adjuvantes diferentes e com polímeros diferentes, alguns trabalhos sugerem que ao aumentar a concentração do polímero ocorre um aumento da viscosidade da fase orgânica aumentando a resistência difusional do ativo da fase orgânica para a fase aquosa (BUDHIAN *et al.*, 2007). Neste trabalho fica evidente que o processo de homogeneização exerce influência considerável tanto sobre a concentração do polímero como em relação a massa de eugenol para a obtenção do sistema final.

A TABELA 19 e a FIGURA 44 apresentam a análise de variância e o Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, para D_{happ} médio das nanocápsulas de PHBV contendo eugenol, respectivamente. Embora não seja uma diferença alta, a análise de variância mostra que o valor de F calculado é superior ao de F tabelado. Portanto, a variação dos parâmetros analisados também apresenta interferência na resposta do D_{happ} das nanocápsulas.

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ} nm) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	p
Regressão	717,9	8	89,7	20,7	19,4	0,04
Resíduo	8,7	2	4,3			
Total	726,5	10		R ² =94,1%		

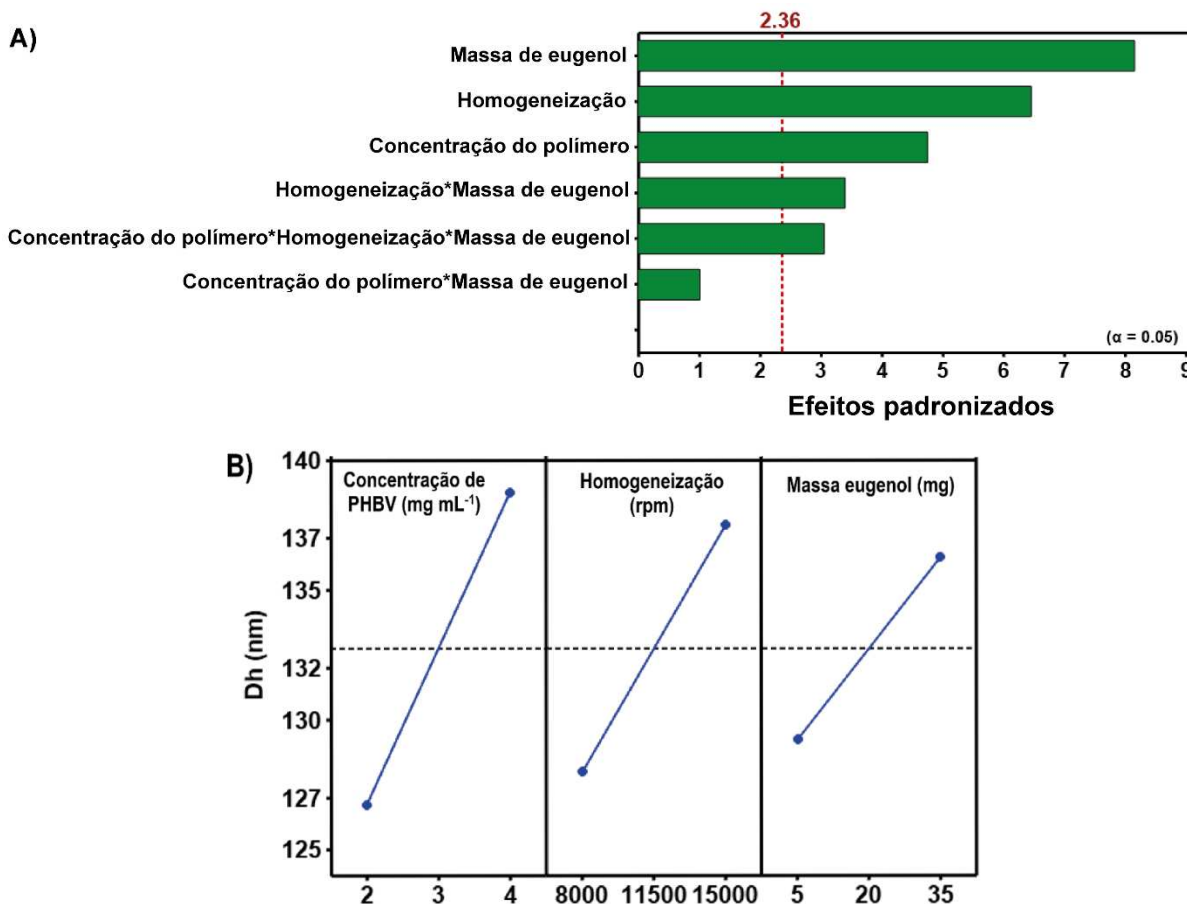
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{calc}: F calculado; F_{tab}: F tabelado, R²: coeficiente de determinação.

Por meio do Diagrama de Pareto (FIGURA 44A) é possível observar em ordem decrescente os efeitos significativos. Em linhas gerais, as interações: velocidade de homogeneização e massa de eugenol; concentração de polímero, velocidade de homogeneização e massa de eugenol; apresentam efeitos significativos em relação ao tamanho das nanocápsulas. Ao observar os efeitos principais (FIGURA 44B) percebe-se que para os níveis inferiores de todas as variáveis há um decréscimo no D_{happ} das nanocápsulas. Quando há um aumento na concentração de polímero ocorre o aumento das forças viscosas da fase orgânica dificultando a quebra das nanogotas. Por isso há a formação de nanocápsulas com D_{happ} maiores. Para quebrar as gotas em gotas menores pode ser aumentada a tensão de cisalhamento da mistura, entretanto, foi observado que ao aumentar a taxa de homogeneização houve também

um aumento do D_{happ} das nanocápsulas, mesmo não sendo tamanhos tão diferentes, indica que o aumento do fornecimento de energia mostrou efeito contrário ao esperado, provavelmente esse fenômeno está associado à quantidade de massa de eugenol utilizada. Nesse sentido, o aumento do D_{happ} das nanocápsulas com o aumento da massa de eugenol deve-se a maior quantidade de ativo retido no núcleo das nanocápsulas.

FIGURA 44 - (A) DIAGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS E (B) EFEITOS PRINCIPAIS PARA O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ} / nm) MÉDIO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL

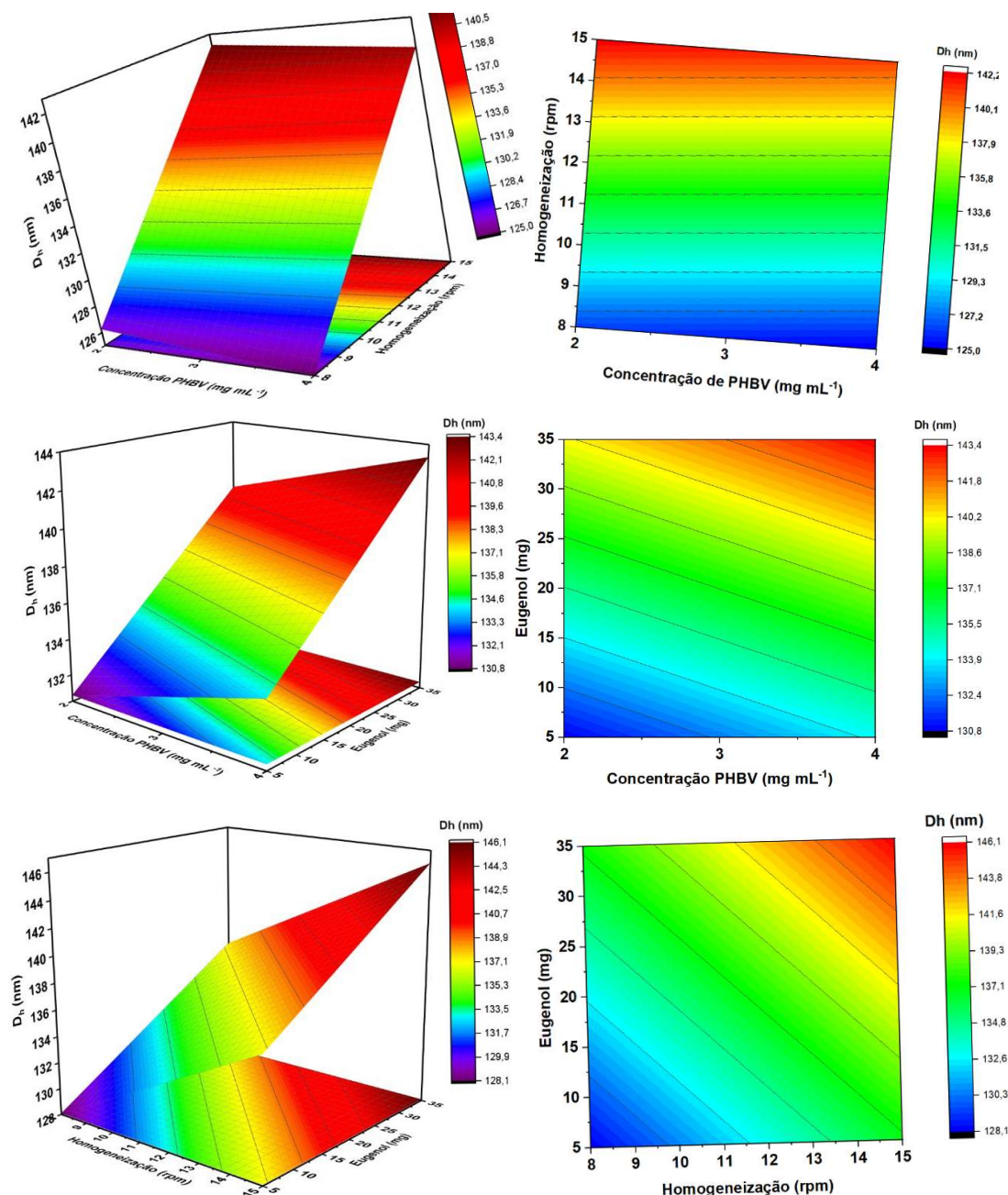


FONTE: O autor (2021)

A FIGURA 45 apresenta as superfícies de resposta e as curvas de contorno para os valores de D_{happ} das nanocápsulas contendo eugenol. É possível observar que para obter as nanocápsulas com D_{happ} menores a concentrações do PHBV independe se ocorre a homogeneização em nível inferior. Por outro lado, o D_{happ} das nanocápsulas é influenciado pela concentração do PHBV quando utilizadas massas diferentes do ativo, menor a concentração de polímero e a quantidade de ativo, menor o tamanho da nanocápsula. Também pode-se perceber que ao utilizar maiores

velocidades de homogeneização há um aumento do tamanho em relação a massa de ativo.

FIGURA 45 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTOURO PARA A VARIAÇÃO DA HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL^{-1}) (A) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS CONCENTRAÇÃO DE PHBV (mg mL^{-1}) (B) MASSA DE EUGENOL (mg) VERSUS HOMOGENEIZAÇÃO (rpm) (C) EM RELAÇÃO AO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ})



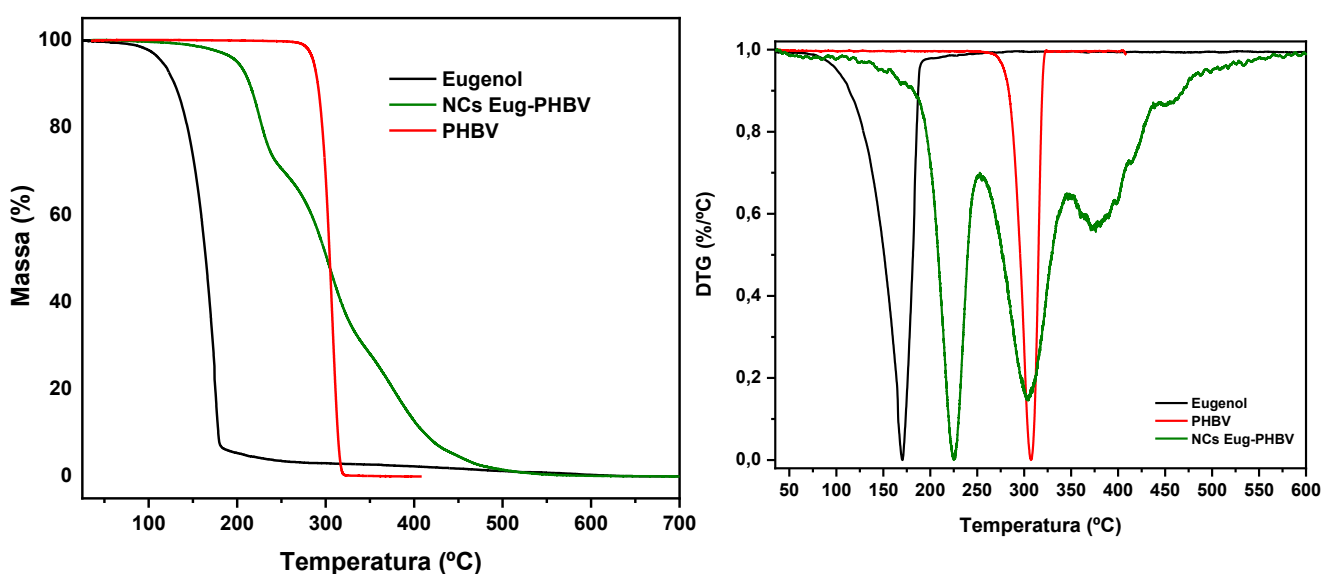
FONTE: O autor (2021)

Para o índice de polidispersão (IPd) foram realizadas as análises, no entanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,8$) entre as amostras e por isso

os dados não foram apresentados. A importância de estudos com delineamento experimental está na busca por experimentos mais assertivos e, dessa forma, limitar partir do empírico na tentativa e erro. Portanto, foi possível obter a melhor condição para preparo das nanocápsulas. Como o D_{happ} não sofreu grandes alterações, a escolha da melhor condição foi baseada na eficiência de incorporação. Dessa forma, para a obtenção das nanocápsulas de PHBV tanto para estudos posteriores com o eugenol como para o linalol e 1-decanol, foram utilizados os parâmetros de menor concentração de PHBV (2 mg mL^{-1}), maior homogeneização (15.000 rpm) e a maior massa de ativo (35 mg), pois mesmo a EI% sendo menor nessa condição, ocorre uma maior incorporação de ativo nas nanocápsulas.

Para confirmar a formação e o comportamento das nanocápsulas contendo o eugenol foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho e térmicas. Da mesma forma que para as Formulações 3 e 4, os espectros na região do infravermelho do eugenol, nanocápsulas PHBV vazias e nanocápsulas Eug-PHBV não apresentaram diferenças significativas e encontram-se na FIGURA A7 (Apêndice). Já os termogramas e a primeira derivada da massa em função da temperatura para o eugenol, PHBV e nanocápsulas de Eug-PHBV encontram-se na FIGURA 46 e os dados detalhados na TABELA 20.

FIGURA 46 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA PARA O EUGENOL, PHBV E NANOCÁPSULAS Eug-PHBV SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO



FONTE: O autor (2021)

TABELA 20 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O EUGENOL, PHBV, NANOCÁPSULAS Eug-PHBV A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

	Primeiro estágio				Segundo estágio				Terceiro estágio			
	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)
Eugenol	170	60	260	93	-	-	-	-	-	-	-	-
PHBV	-	-	-	-	305	265	325	99	-	-	-	-
NCs Eug-PHBV	220	150	250	41	320	260	380	39	415	380	440	27

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: T_i – Temperatura inicial; T_f – Temperatura final; T_p – Temperatura de pico.

O eugenol apresenta decomposição térmica com perda de massa (97,4%) na faixa de 60 a 260 (T_{pico} : 170 °C), com total decomposição até 270 °C. Para as nanocápsulas na presença de eugenol, as perdas de massas na faixa de 150 a 250 °C e 380° a 440 °C podem ser relativas à decomposição dos aditivos presentes na formulação. Por outro lado, para o polímero e para as nanocápsulas a perda de massa na faixa 280 a 380 °C pode ser referente a decomposição das cadeias poliméricas do PHBV e do ativo encapsulado.

4.4.5. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo linalol e 1-decanol

Formulações 6 e 7

Nesta etapa do trabalho, foram desenvolvidas as Formulações 6 e 7 utilizando o polímero PHBV, carregadas com linalol ou 1-decanol a partir do método de deposição interfacial de polímero pré-formado e utilizando as condições mais adequadas observadas para o eugenol. Os valores de D_{happ} encontram-se expostos na TABELA 21.

Observa-se que o D_{happ} das nanocápsulas para ambos os compostos se situaram na faixa de 213 a 357 nm. Em comparação com as amostras contendo eugenol, as nanocápsulas de Lin-PHBV e 1Dec-PHBV apresentaram diâmetros médios superiores, independente da massa de ativo utilizada, isso se deve supostamente pela melhor interação dos ativos com o polímero. Além disso, quanto maior a massa de linalol ou 1-decanol, maior a quantidade de ativo no interior da nanocápsula e, possivelmente, maior será seu tamanho médio. O IPd variou de 0,250

a 0,300 para todas as amostras indicando nanocápsulas com distribuição de tamanho uniformes. Os valores de potencial ζ para as nanocápsulas tanto de linalol como 1-decanol estão dentro ou próximo ao regime de estabilidade de -30 mV.

TABELA 21 - VALORES DE POTENCIAL ζ E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D_{happ}) MÉDIO PARA AS NANOCÁPSULAS DE LINALOL E 1-DECANOL

Massa (mg)	Linalol		1-Decanol	
	Potencial ζ (mV) \pm DP	D_{happ} (nm) \pm DP DLS	Potencial ζ (mV) \pm DP	D_{happ} (nm) \pm DP DLS
5	-26,5 \pm 0,8	226 \pm 64	-23,2 \pm 1,1	213 \pm 70
20	-31,5 \pm 1,1	254 \pm 37	-26,9 \pm 4,6	247 \pm 18
35	-35,8 \pm 0,5	347 \pm 132	-30,6 \pm 1,8	357 \pm 113

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: DP = Desvio padrão.

Em seguida, foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho e análises termogravimétricas para as amostras. Os espectros na região do infravermelho para os ativos e para as nanocápsulas na ausência e na presença dos ativos encontra-se na FIGURA A8 (Apêndice). Os termogramas e as curvas da primeira derivada da massa em função da temperatura encontram-se na FIGURA 47A para o linalol, PHBV e nanocápsulas de Lin-PHBV e FIGURA 47B para o 1-decanol, PHBV e as nanocápsulas de 1Dec-PHBV e os dados detalhados na TABELA 22.

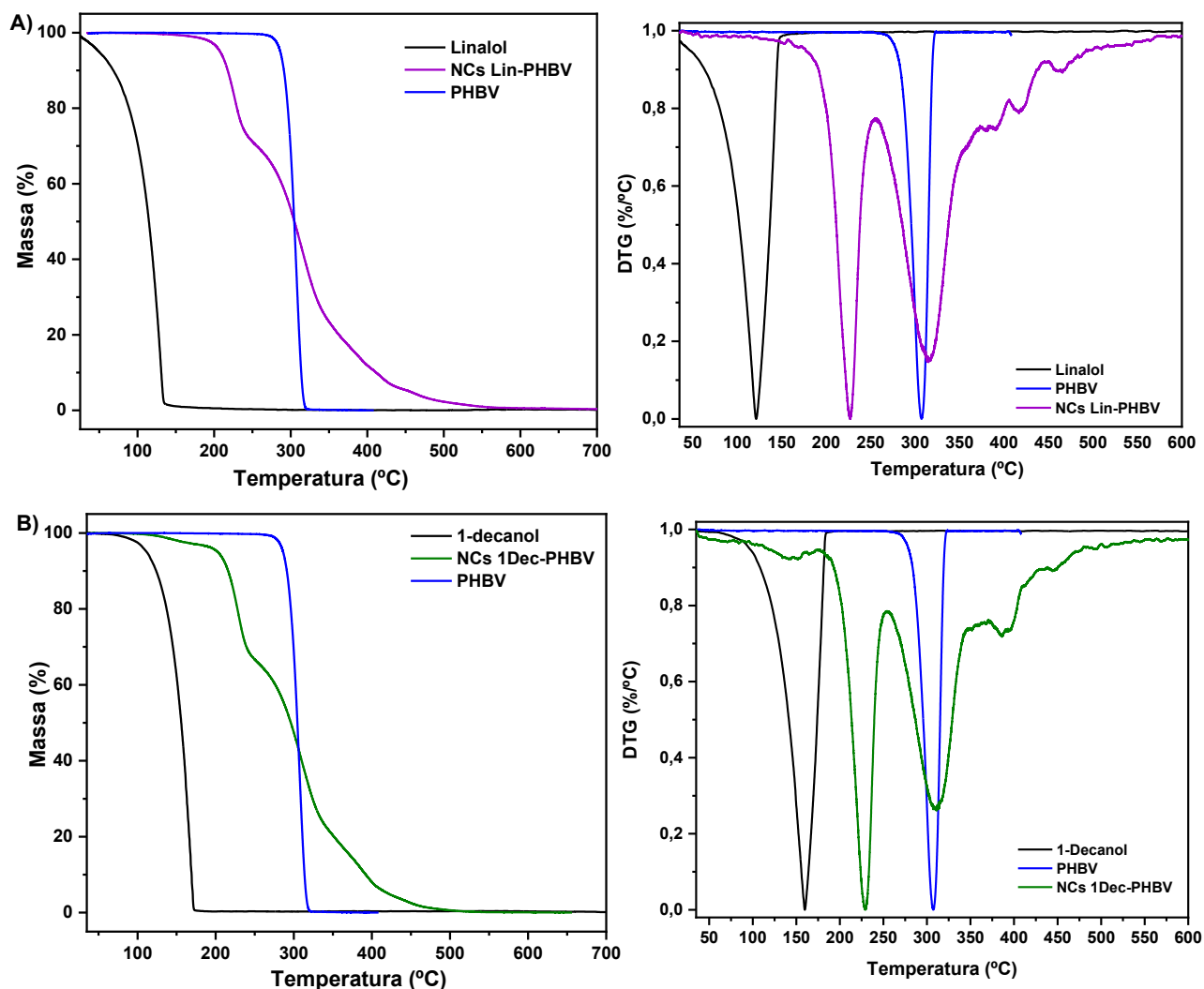
TABELA 22 - PARÂMETROS TÉRMICOS OBTIDOS PARA O LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DOS ATIVOS A PARTIR DE ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

	Primeiro estágio				Segundo estágio				Terceiro estágio			
	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)	T_p (°C)	T_i (°C)	T_f (°C)	massa (%)
Linalol	120	35	150	98	-	-	-	-	-	-	-	-
NCs Lin-PHBV	-	-	-	-	225	160	250	24	320	260	400	76
PHBV	-	-	-	-	-	-	-	-	305	265	325	99
1-Decanol	160	62	183	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCs 1Dec-PHBV	150	90	180	4	230	180	250	29	310	260	370	67

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: T_i – Temperatura inicial; T_f – Temperatura final; T_p – Temperatura de pico.

FIGURA 47 - TERMOGRAMAS E PRIMEIRA DERIVADA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA O (A) LINALOL, PHBV E NANOCÁPSULAS Lin-PHBV, (B) 1-DECANOL, PHBV E NANOCÁPSULAS 1Dec-PHBV SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO



FONTE: O autor (2021)

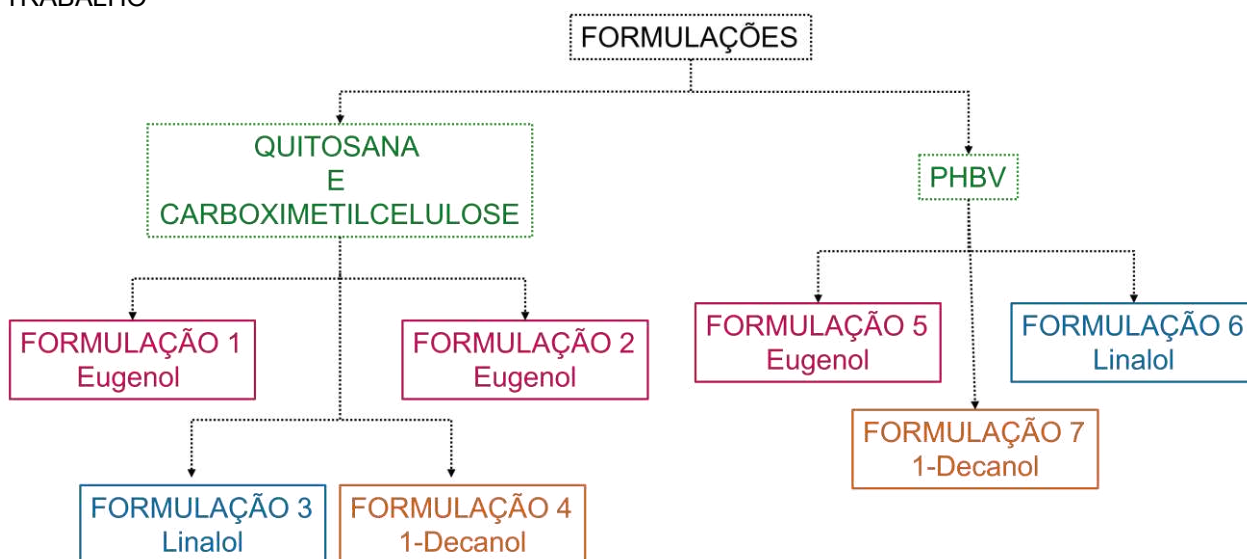
O linalol apresenta decomposição térmica com perda de massa (98%) na faixa de 35 a 150 (T_{pico} : 120 °C). O 1-decanol sofre decomposição na faixa entre 62 e 283 °C (T_{pico} : 160 °C) indicando compostos termicamente instáveis. Para as nanocápsulas na ausência e na presença dos ativos, a perda de massa na faixa de 260 a 450 °C pode ser relativa à decomposição dos aditivos da formulação e do polímero. Assim como para o eugenol, para as nanocápsulas de linalol ou 1-decanol as perdas de massas na faixa de 180 a 250 °C podem ser relativas à decomposição dos aditivos presentes nas formulações. O polímero puro decompõe-se na faixa de 265 a 325 °C, com perda de massa de 99%. Já para as nanocápsulas contendo os ativos a perda de massa na faixa 260 a 400 °C pode ser referente a decomposição das cadeias

poliméricas do PHBV e dos ativos encapsulado. Além do mais, para as nanocápsulas contendo 1-decanol, observa-se uma pequena perda de massa de 4% na faixa de 90 a 180 °C, supostamente pela perda de ativo aderido à superfície da nanocápsula.

4.5. EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO, LIBERAÇÃO *in vitro*, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PROPRIEDADES DE SUPERFÍCIE

A partir dessa parte do trabalho as formulações são separadas por análises. Na FIGURA 48 encontra-se um fluxograma de forma simplificada com o intuito de relembrar as formulações produzidas durante o desenvolvimento do trabalho. Até a Formulação 4 foi utilizado o método de autoassociação LbL, as demais formulações foram obtidas pelo método de deposição interfacial. As diferenças entre as Formulações 1 e 2 estão na preparação da nanoemulsão, além da maior quantidade de eugenol e o preparo da nanoemulsão, sendo encontrado o tempo de 10 min com a menor dispersão das gotículas. Além do mais, foi adotada a adição da nanoemulsão sobre a dispersão polimérica para a obtenção das nanocápsulas, até então realizada de forma contrária para a Formulação 1. As Formulações 3 e 4 foram obtidas utilizando as condições da Formulação 2 e com as concentrações das dispersões de polímeros a 0,5 mg mL⁻¹. Já as Formulações 5, 6 e 7 foram obtidas utilizando o polímero PHBV e com os ativos eugenol, linalol e 1-decanol respectivamente.

FIGURA 48 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO



FONTE: O autor (2021)

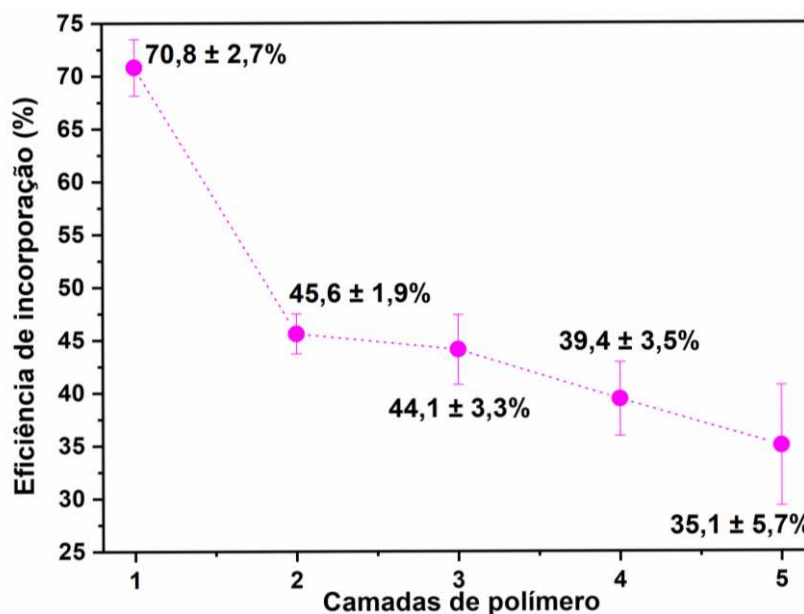
4.5.1. Eficiência de incorporação

4.5.1.1. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol

Inicialmente, foram determinadas as eficiências de incorporação para as Formulações 1 e 2, referentes as nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol. A solubilidade do eugenol em água e clorofórmio foi determinada utilizando espectroscopia na região do UV-Vis. Os resultados foram $2,41 \text{ g L}^{-1}$ e $8,18 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Em seguida, as eficiências de incorporação do eugenol nas nano e microcápsulas foram determinadas utilizando a espectroscopia na região do UV-Vis (281 nm). Por meio da equação da reta (absorvância = $0,019 \times [\text{eugenol}] + 0,020$, $r=0,999$, limite de detecção (LOD): $0,96 \text{ mg L}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ): $2,50 \text{ mg L}^{-1}$) (ICH, 2005) e da Equação 7 (p. 72) os valores foram obtidos e são apresentados na FIGURA 49.

Usando diferentes camadas de polissacarídeo e mantendo a massa de eugenol constante, a eficiência de incorporação variou de $70,8 \pm 2,7\%$ a $35,1 \pm 5,7\%$ (FIGURA 49), indicando que após a centrifugação e subsequente deposição de cada camada de polieletrólito, houve uma redução da eficiência de incorporação. Essa perda do ingrediente ativo provavelmente foi devido ao arraste causado pelo intenso processo de cisalhamento da amostra, gerada pela força centrífuga. A diminuição da eficiência de incorporação mais acentuada entre as nanocápsulas Eugenol-LbL₁ e Eugenol-LbL₂ pode estar relacionada à presença do eugenol entre as camadas poliméricas das nanocápsulas. Após a deposição da segunda camada de polímero, não houve alteração considerável na eficiência de incorporação. O valor máximo da eficiência de incorporação de $70,8 \pm 2,7\%$ foi provavelmente alcançado devido à saturação das nanocápsulas Eugenol-LbL₁ com eugenol (WORANUCH; YOKSAN, 2013).

FIGURA 49 - EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO APÓS A DEPOSIÇÃO DE CADA CAMADA DE POLÍMERO



FONTE: O autor (2021)

Nota: a linha é uma referência visual

Para a Formulação 2 (nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo de eugenol) foi adotada uma maior massa de eugenol (35 mg) e maiores volumes das dispersões poliméricas quando comparada à Formulação 1, sendo observado fenômenos semelhantes à essa formulação. Após o processo de centrifugação, houve diminuição da eficiência de incorporação, para as nanocápsulas com uma camada de polímero (Eug-LbL₁) de 8,3 ± 0,1% e para nanocápsulas com duas camadas de polímero (Eug-LbL₂) de 5,1 ± 0,3%. A centrifugação é uma etapa essencial na preparação das nanocápsulas, pois remove excesso de polímero que não reagiu e de ativo que não foi encapsulado, entretanto, provoca esse arraste das moléculas do ativo que possivelmente estão mais próximas à superfície das nanocápsulas.

4.5.1.2. Nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol e 1-decanol

Nesta etapa, foram determinadas a eficiência de incorporação do linalol e 1-decanol para as Formulações 3 e 4 (preparadas com os polímeros quitosana e carboximetilcelulose). A eficiência de incorporação do linalol e 1-decanol nas

nanocápsulas foi determinada utilizando CLAE com detector de Ultravioleta (UV-Vis - 207 nm) e CLAE com detector de índice de refração (IR), respectivamente. As equações lineares para o linalol e 1-decanol foram Absorvância = $283,46 \times [\text{linalol}] - 78,7$ com $r=0,999$ (LOD: $0,91 \mu\text{g mL}^{-1}$ e LOQ: $2,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) (ICH, 2005) e Absorvância = $2572,267 \times [1\text{-decanol}] - 108,04$ com $r=0,999$ (LOD: $15,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ e LOQ: $47,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) (ICH, 2005), respectivamente. Os valores de eficiência de incorporação foram obtidos utilizando a Equação 7 (p. 72) e podem ser observados na TABELA 23.

Foram utilizadas dispersões de quitosana e carboximetilcelulose com concentrações diferentes a fim de observar se poderia ocorrer alguma influência sobre a eficiência de incorporação. Como pode ser observado na TABELA 23 a quantidade de ativo incorporada nas nanocápsulas foi afetada pela concentração do polímero. Menores concentrações promoveram maiores eficiência de incorporação. Possivelmente devido a melhor interação entre polímero e nanoemulsão, uma vez que dispersões em menores concentrações podem possuir moléculas com cadeias poliméricas mais desimpedidas para interações iônicas. Além disso, foi observado efeito semelhante ao observado para o eugenol. Após o processo de centrifugação, ocorre a diminuição da eficiência de incorporação.

TABELA 23 - EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%) DO LINALOL E 1-DECANOL EM NANOCÁPSULAS COM QUITOSNA (LbL₁) E COM CARBOXIMETILCELULOSE (LbL₂)

Concentração de polímero (mg mL ⁻¹)	Eficiência de incorporação (%)			
	Linalol		1-Decanol	
	LbL ₁ % ± DP	LbL ₂ % ± DP	LbL ₁ % ± DP	LbL ₂ % ± DP
0,5	11,3 ± 1,1	2,4 ± 0,9	21,8 ± 1,2	16,5 ± 0,6
1,0	10,7 ± 0,6	3,7 ± 0,1	19,8 ± 0,3	13,3 ± 1,4
2,0	6,8 ± 0,2	1,9 ± 0,7	16,3 ± 1,1	11,8 ± 1,6

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: DP= Desvio padrão.

4.5.1.3. Nanocápsulas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) contendo eugenol, linalol e 1-decanol

Nesta parte do trabalho, foram determinadas as eficiências de incorporação dos ativos eugenol, linalol e 1-decanol presentes nas nanocápsulas obtidas com o polímero PHBV (Formulações 5, 6 e 7, respectivamente). Após realizar o

delineamento experimental e delimitar os valores de concentração do polímero e homogeneização do sistema, foram obtidos valores de eficiência de incorporação para diferentes massas de eugenol. Foi utilizando a espectroscopia na região do UV-Vis (281 nm), a equação linear ($\text{Absorvância} = 0,01767 \times [\text{eugenol}] - 0,04766$ com $r=0,998$) e a Equação 6 (p. 69). Para 5 mg de eugenol foi obtida uma eficiência de incorporação de $30,9 \pm 2,3\%$, para 20 mg de $11,6 \pm 1,4\%$ e para 35 mg de $10,3 \pm 2,2\%$. Dessa forma, para o sistema contendo 35 mg de eugenol mesmo a eficiência de incorporação sendo menor, a massa incorporada foi maior, portanto, para testes posteriores foi utilizada esta condição.

Para o linalol e 1-decanol a eficiência de incorporação nas nanocápsulas foi determinada utilizando CLAE-UV-Vis (207 nm) e CLAE-IR, respectivamente. Os valores foram obtidos utilizando a Equação 7 (p. 72). Para os experimentos com linalol e 1-decanol foram adotadas as melhores condições experimentais observadas para eugenol. Portanto, foi utilizada a massa de 35 mg de cada composto e determinada a eficiência de incorporação, e os valores observados para o linalol e 1-decanol foram de $10,3 \pm 0,6\%$ e $22,7 \pm 1,8\%$, respectivamente. Essa eficiência de incorporação maior para o 1-decanol em relação ao eugenol e ao linalol pode estar relacionada com a polaridade dos compostos, 1-decanol é menos polar e, dessa forma, pode apresentar uma maior interação com o polímero PHBV.

Os cromatogramas com os perfis de eluição do linalol e do 1-decanol encontram-se nas FIGURAS A9 (obtido por CLAE-UV-Vis), A10 (obtido por CLAE-IR) e A11 (obtido por CG-EM) (Apêndice).

4.5.2. LIBERAÇÃO *in vitro*

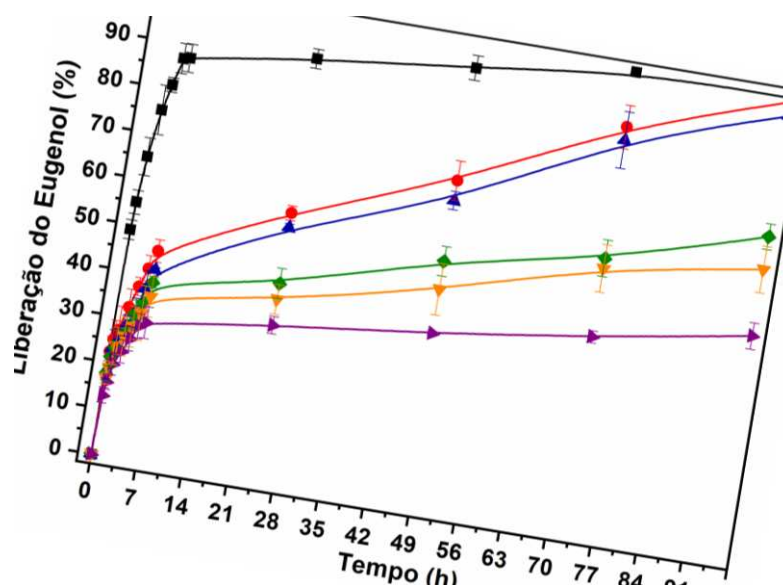
Formulação 1 - composta pela nanoemulsão de eugenol revestida com até cinco camadas poliméricas de quitosana e carboximetilcelulose. Este sistema foi preparado utilizando 2 min de sonicação da nanoemulsão, concentração dos polímeros de 2 mg mL^{-1} e adição do polímero sobre a nanoemulsão.

Após estudos prévios para otimizar a liberação do eugenol, foi definida a melhor condição condizente com a liberação em sistemas reais. A liberação *in vitro* do eugenol foi realizada em água purificada a 25°C e pH 6,8. A concentração de eugenol liberada das cápsulas com diferentes números de camadas de polímero foi

expressa como uma porcentagem do eugenol total disponível, calculada usando uma curva de calibração e plotada em função do tempo (FIGURA 50).

Todas as cápsulas exibiram uma liberação inicial (*burst*) (15 min) de $22,3 \pm 3,2$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₁) a $12,9 \pm 1,6$ % (nanocápsulas Eugenol-LSS-LbL₂) (FIGURA 50), possivelmente relacionada à liberação das moléculas de eugenol adsorvidas na superfície da nanoemulsão ou incorporadas próximas à superfície, entre as camadas de polímeros (SHAO *et al.*, 2018). Essas liberações iniciais (*burst*) foram menores em comparação com a nanoemulsão de eugenol (Eugenol-LSS) ($48,9 \pm 2,1$ %). Além disso, a nanoemulsão exibiu uma liberação rápida de $87,2 \pm 3,0$ % após 5 h. Por outro lado, as cápsulas exibiram liberações de $45,3 \pm 2,4$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₁), $41,2 \pm 0,6$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₂), $38,5 \pm 1,1$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₃), $35,4 \pm 4,4$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₄) e $29,7 \pm 3,4$ % (nanocápsulas Eugenol-LbL₅) seguidos de uma liberação mais gradual e lenta. Portanto, esses resultados sugerem que as cápsulas são capazes de modular a liberação de eugenol, em comparação com a nanoemulsão.

FIGURA 50 - PERFIL DE LIBERAÇÃO *in vitro* DO EUGENOL: NANOEMULSÃO Eugenol-LSS (-■-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₁ (-●-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₂ (-▲-), NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₃ (-◆-), MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL₄ (-▼-) E MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL₅ (-►-)



FONTE: O autor (2021)

As duas primeiras camadas poliméricas, nanocápsulas Eugenol-LbL₁ e Eugenol-LbL₂, exibiram liberação do eugenol de $99,2 \pm 1,8$ % e $96,1 \pm 0,5$ %, respectivamente, após aproximadamente 96 h. Para as cápsulas Eugenol-LbL₃ a

Eugenol-LbL₅, foi observada uma diminuição no perfil de liberação após 96 h, o que correspondeu inversamente ao número crescente de camadas de polímero ($69,9 \pm 1,8\%$ a $48,4 \pm 2,8\%$). Pode-se inferir a partir desses resultados que o aumento no número de camadas de polímero há uma diminuição na liberação de eugenol. Como observado nos experimentos de QCM-D, a camada polimérica rígida de quitosana e carboximetilcelulose na superfície das nanoemulsões deve controlar a cinética de liberação do ativo.

O perfil de liberação do eugenol nas cápsulas foi avaliado utilizando o modelo matemático de primeira ordem (Equação 16). Este modelo caracteriza-se por apresentar a liberação do ativo de forma proporcional à quantidade remanescente em seu interior, de modo que a quantidade de ativo liberada por unidade de tempo diminua. A TABELA 24 mostra as constantes cinéticas (k) e os coeficientes de correlação linear (r) para o sistema calculados por regressão linear. Esta análise revelou uma diminuição nos valores de k das nanocápsulas Eugenol-LbL₁ para as microcápsulas Eug-LSS-LbL₅, indicando que a taxa de liberação foi afetada pelo número de camadas.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t \quad (\text{Eq. 16})$$

em que Q_t é a quantidade de ativo liberada no tempo t , Q_0 a quantidade inicial de ativo na solução e k_1 a constante de liberação de ordem um.

TABELA 24 - VALORES DOS PARÂMETROS OBTIDOS APÓS A APLICAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO DE PRIMEIRA ORDEM PARA A NANOEMULSÃO DE Eugenol, NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₁, NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₂, NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₃, MICROCÁPSULAS Eugenol-LbL₄ E MICROCÁPSULAS Eugenol-LSS-LbL₅

Amostras	Modelo de primeira ordem	
	Coefficiente de correlação	Constante de liberação
	(r)	(k) / min ⁻¹
Nanoemulsão Eugenol	0,915	0,015
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₁	0,998	0,008
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₂	0,997	0,008
Nanocápsulas Eugenol-LbL ₃	0,995	0,007
Microcápsulas Eugenol-LbL ₄	0,956	0,006
Microcápsulas Eugenol-LbL ₅	0,922	0,005

FONTE: O autor (2021)

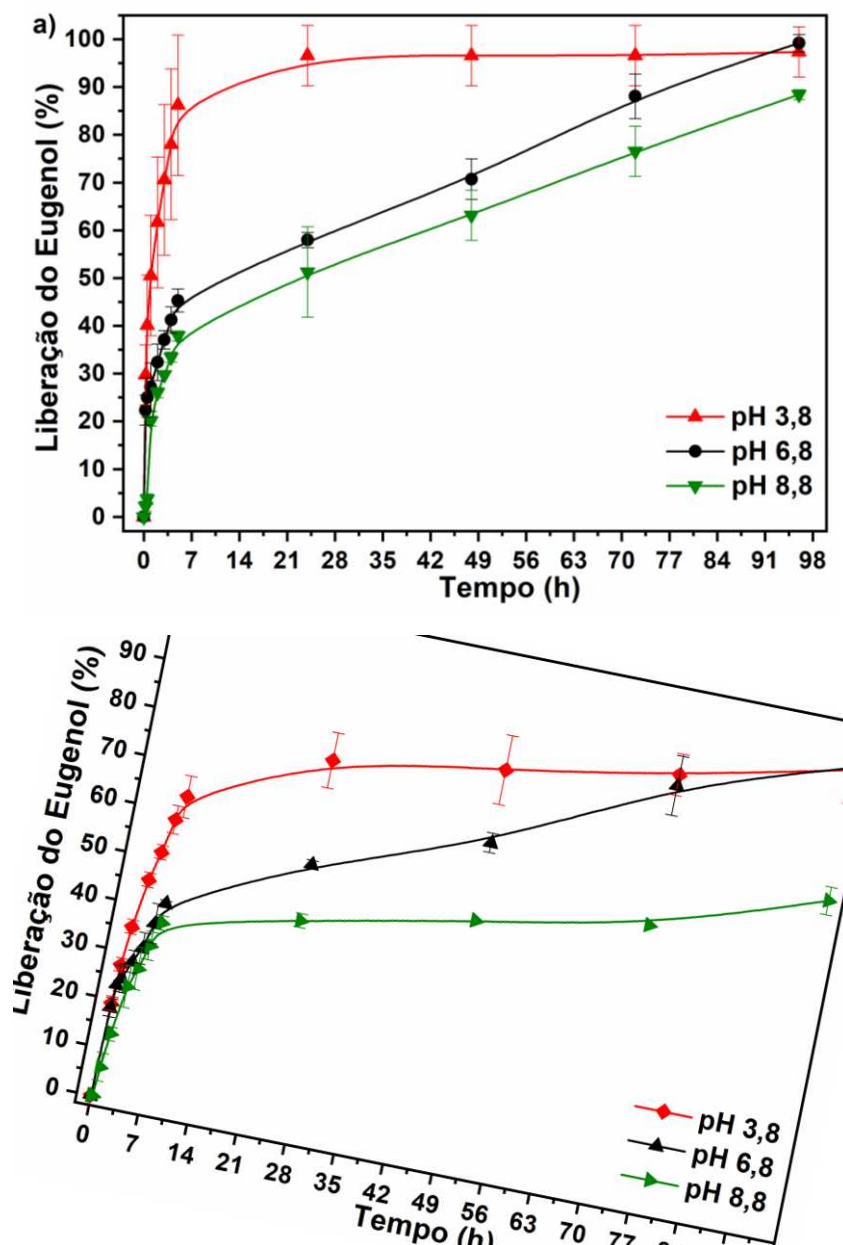
Assim, com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o revestimento com multicamadas de polieletrólitos prolonga o tempo de liberação de eugenol e diminui a liberação inicial *burst*. Estudos similares foram reportados na literatura, por exemplo, Chai e colaboradores (2017) produziram nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) carregadas com doxorubicina, nas quais depositaram camadas de alginato de sódio e quitosana alternadamente, observando que à medida que mais camadas foram adicionadas, a taxa de liberação do fármaco se tornava mais lenta.

Em seguida, para determinar o efeito do pH do meio na liberação do eugenol, este parâmetro foi avaliado em pH 3,8 e 8,8 (FIGURA 51). Como as nanocápsulas de Eugenol-LbL₁ e nanocápsulas de Eugenol-LbL₂ exibiram uma liberação do eugenol de aproximadamente 100% após o tempo máximo avaliado anteriormente, essas nanocápsulas foram selecionadas para avaliar o efeito do pH do meio.

Para pH 3,8 (TABELA 25), as nanocápsulas apresentaram liberações iniciais (*burst*) de $29,7 \pm 6,3\%$ e $19,1 \pm 1,4\%$ para as nanocápsulas Eugenol-LbL₁ e nanocápsulas Eugenol-LbL₂, respectivamente. Em 5 h de avaliação, foram observadas taxas de liberação mais altas no meio ácido, $86,2 \pm 14,7\%$ (nanocápsulas Eugenol-LbL₁) e $63,4 \pm 4,3\%$ (nanocápsulas Eugenol-LbL₂), em comparação com o meio de pH 6,8 no mesmo tempo de liberação ($45,3,3 \pm 2,4\%$ (nanocápsulas Eugenol-LbL₁) e $41,2 \pm 0,6\%$ (nanocápsulas Eugenol-LbL₂)). No entanto, em pH 8,8 (TABELA 25), os valores inicial e máximo para liberação de eugenol diminuíram consideravelmente para as nanocápsulas Eugenol-LbL₁ e nanocápsulas Eugenol-LbL₂.

No caso das nanocápsulas com apenas a camada de quitosana (FIGURA 51a), a liberação mais rápida no meio ácido pode ser explicada pela protonação dos grupos amino em meios com pH abaixo de 6,5. Assim, a repulsão das cargas positivas favorecem a liberação da substância ativa (CHEN *et al.*, 2017, WANG *et al.*, 2018). Ao aumentar o pH do meio ($> 6,5$), o grupo amino tende a sua forma não iônica, resultando na compactação dos nanocápsulas e uma consequente diminuição na taxa de liberação de eugenol.

FIGURA 51 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EUGENOL EM (a) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₁ EM MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH A 25 °C: (-▲- pH 3,8), (-●- pH 6,8) E (-▼- pH 8,8); (b) NANOCÁPSULAS Eugenol-LbL₂ EM MEIOS COM DIFERENTES VALORES DE pH A 25 °C: (-◆- pH 3,8), (-▲- pH 6,8) E (-▼- pH 8,8)



FONTE: O autor (2021)

Para as nanocápsulas com duas camadas poliméricas (FIGURA 51b), a carboximetilcelulose está parcialmente ionizada em pH 3,8, enquanto a quitosana está totalmente ionizada, possivelmente promovendo a abertura de poros na superfície. No entanto, devido à interação entre quitosana e carboximetilcelulose, a liberação foi menos pronunciada do que a observada na FIGURA 51a. O aumento do pH do meio resultou em uma redução na ionização da quitosana, ao contrário da

carboximetilcelulose, reduzindo assim os poros presentes na superfície e consequentemente diminuindo a liberação do eugenol (KASSEM *et al.*, 2014 e WANG *et al.*, 2018). Os resultados indicam que a liberação inicial do eugenol depende do pH do meio, e observa-se que à medida que o pH aumenta, a liberação inicial diminui.

TABELA 25 - EFEITO DO pH DO MEIO NA LIBERAÇÃO DO EUGENOL A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA (Eugenol-LbL₁) E CARBOXIMETILCELULOSE (Eugenol-LbL₂)

Nanocápsulas Eugenol-LbL ₁ Quitosana			Nanocápsulas Eugenol-LbL ₂ Carboximetilcelulose	
pH	Liberação inicial <i>burst</i> (%) ± DP	Porcentagem de liberação (%) ± DP	Liberação inicial <i>burst</i> (%) ± DP	Porcentagem de liberação (%) ± DP
3,8	29,7 ± 6,3	97,3 ± 5,3	19,1 ± 1,4	95,5 ± 7,1
6,8	22,3 ± 3,2	99,1 ± 1,8	18,2 ± 1,9	96,1 ± 0,5
8,8	2,3 ± 1,1	88,4 ± 1,1	0	63,4 ± 2,8

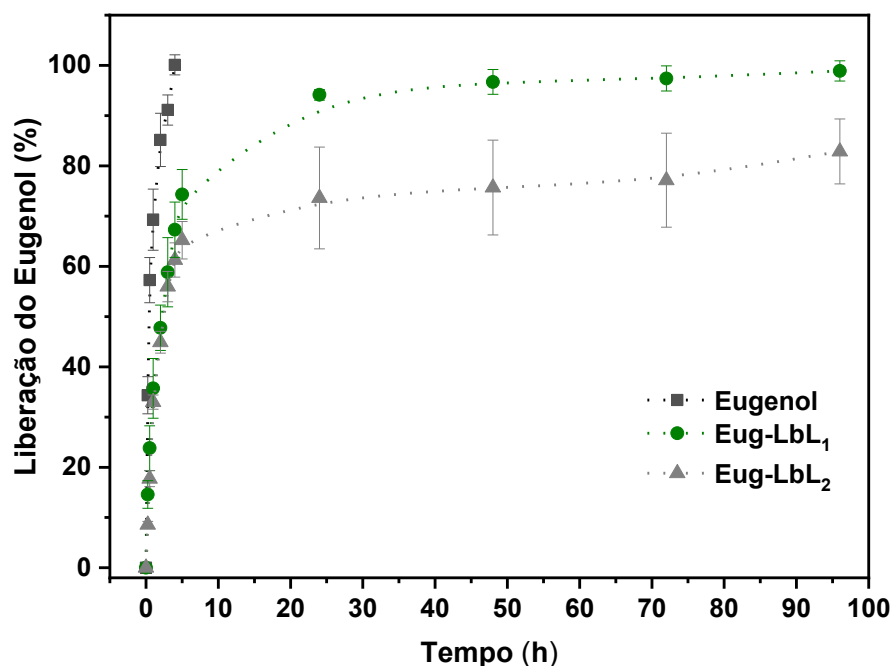
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: DP= Desvio padrão.

Formulação 2 - composta pela nanoemulsão de eugenol revestida com até duas camadas poliméricas de quitosana e carboximetilcelulose. Estas nanocápsulas foram preparadas utilizando maior tempo de sonicação da nanemulsão (10 min), concentração de polímero de 2 mg mL⁻¹ e adição da nanoemulsão sobre o polímero. Nesta formulação, foram aumentadas as quantidades de ativo, assim como dos polímeros utilizados em relação a Formulação 1.

O perfil de liberação do eugenol para a Formulação 2 foi similar ao observado para a Formulação 1. Utilizando água purificada como meio receptor a 25 °C, o eugenol foi quantificado por espectroscopia UV-Vis, os dados foram normalizados de acordo com a eficiência de incorporação de cada nanocápsula e os valores foram expressos como porcentagem do eugenol total disponível, obtidos a partir da curva de calibração e plotados em função do tempo. Na FIGURA 52 é possível observar que para o eugenol livre ocorre uma liberação rápida nos primeiros 15 min (34,4 ± 3,7%), alcançando sua liberação total após 4 h. Em contrapartida, o eugenol encapsulado em LbL₁ apresenta uma liberação substancial nas primeiras horas, seguida por uma liberação mais gradual.

FIGURA 52 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EUGENOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (-■-) Eugenol livre (-●-) NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁, (-▲-) NANOCÁPSULAS Eug-LbL₂



FONTE: O autor (2021)

Esta liberação rápida de eugenol a partir das nanocápsulas pode estar correlacionada com uma maior quantidade de eugenol entre a nanoemulsão e a primeira camada de polímero. As nanocápsulas Eug-LbL₁ apresentaram uma liberação de *burst* inicial (30 min) de $23,8 \pm 4,4\%$, enquanto as nanocápsulas com duas camadas de polímero apresentaram essa liberação de $17,7 \pm 3,7\%$. A diminuição na liberação está relacionada diretamente com o número de camadas de polímero adicionais às nanocápsulas como observado anteriormente para a Formulação 1.

O comportamento de liberação do eugenol foi analisado pela equação de primeira ordem (Equação 16, p. 146). Os valores obtidos foram $0,057 \text{ min}^{-1}$ para o eugenol livre, $0,033 \text{ min}^{-1}$ para as nanocápsulas Eug-LbL₁ e $0,031 \text{ min}^{-1}$ para as nanocápsulas Eug-LbL₂. Esses resultados indicam que à medida que o número de camadas poliméricas aumentou, ocorreu uma diminuição da k , consequentemente, uma liberação mais lenta do eugenol.

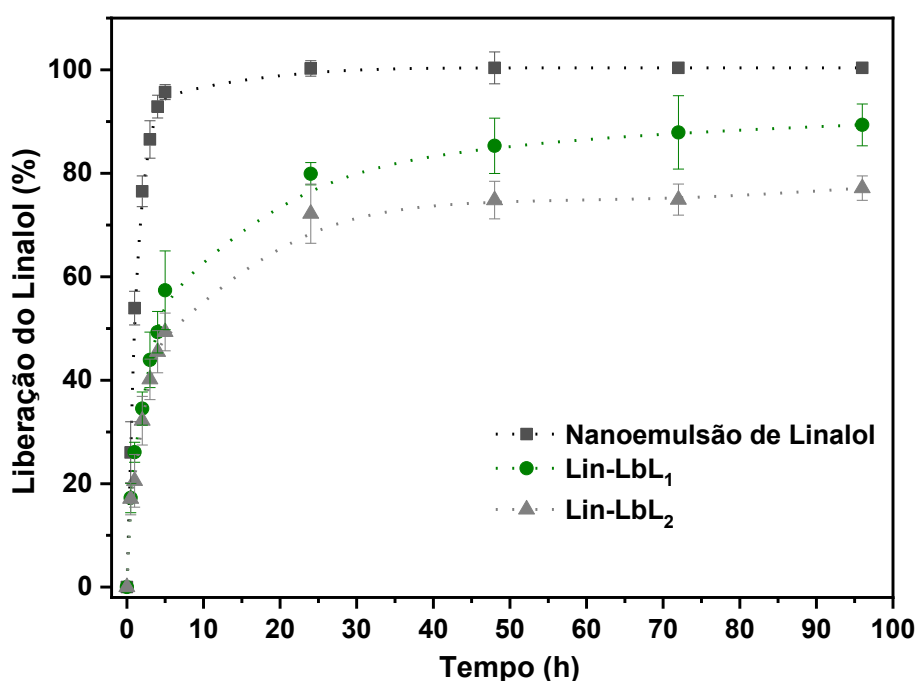
Formulação 3 - composta pela nanoemulsão de linalol revestida com até duas camadas poliméricas de quitosana e carboximetilcelulose. **Formulação 4** - composta pela nanoemulsão de 1-decanol revestida com até duas camadas poliméricas de quitosana e carboximetilcelulose. Essas formulações foram preparadas utilizando

maior tempo de sonicação da nanemulsão (10 min), menor concentração de polímero ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e adição da nanoemulsão sobre a dispersão polimérica.

As liberações *in vitro* do linalol e 1-decanol foram realizadas em água purificada contendo polissorbato 80 ($1,5\% \text{ m V}^{-1}$) a 25°C . A concentração dos ativos liberados das nanocápsulas foi expressa em porcentagem do linalol ou 1-decanol total disponível, calculadas por meio das curvas de calibração e plotadas em função do tempo.

O perfil de liberação para o linalol e para o 1-decanol a partir das nanoemulsões e das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose podem ser observados na FIGURA 53 e 54, respectivamente. O linalol apresentou perfil de liberação similar ao eugenol. Para o linalol, a nanoemulsão apresenta uma liberação mais rápida alcançando $95,6 \pm 1,4\%$ após 5 h. Por outro lado, as nanocápsulas com uma e duas camadas poliméricas apresentam uma diminuição na liberação, sendo uma liberação mais rápida no início seguida de uma liberação bem mais lenta ao longo do tempo.

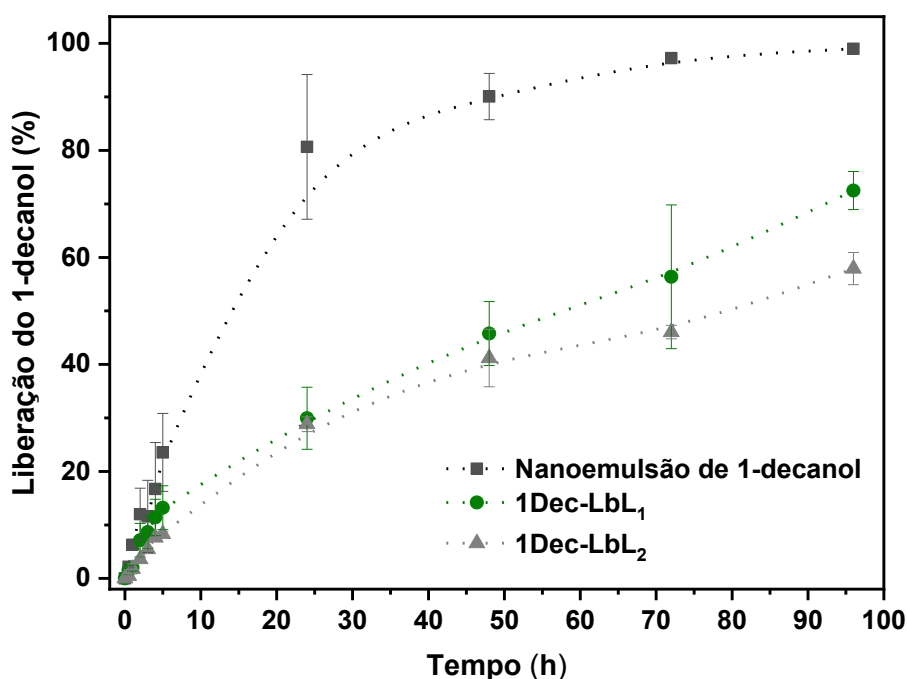
FIGURA 53 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO LINALOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (-■-) NANOEMULSÃO DE LINALOL (-●-) NANOCÁPSULAS Lin-LbL₁, (-▲-) NANOCÁPSULAS Lin-LbL₂



FONTE: O autor (2021)

O 1-decanol apresentou um comportamento de liberação um pouco diferente do eugenol e do linalol. Tanto a nanoemulsão como as nanocápsulas mostram uma liberação mais lenta nas primeiras horas, seguida por uma liberação crescente ao longo do tempo. Para a nanoemulsão de 1-decanol cerca de $23,5 \pm 7,2\%$ do ativo foi liberado após 5 h. Já para as nanocápsulas 1Dec-LbL₁ e 1Dec-LbL₂ em 5 h se observou uma liberação de $13,2 \pm 4,1\%$ e $8,3 \pm 1,0\%$, respectivamente. Esse comportamento pode estar associado a solubilidade do ativo ou mesmo com a interação mais pronunciada do ativo com a nanoemulsão e com as nanocápsulas. Uma vez que o 1-decanol é pouco solúvel em água, há a preferência dele permanecer junto aos materiais que possua maior afinidade. Nesta direção, foi utilizado um surfactante na fase receptora, e assim, ao longo do tempo o 1-decanol associado à presença do polisorbato 80, foi liberado da nanoemulsão e das nanocápsulas.

FIGURA 54 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO 1-DECANOL A PARTIR DE NANOCÁPSULAS COM ATÉ DUAS CAMADAS POLIMÉRICAS (■-) NANOEMULSÃO DE 1-DECANOL (-●-) NANOCÁPSULAS 1Dec-LbL₁, (-▲-) NANOCÁPSULAS 1Dec-LbL₂



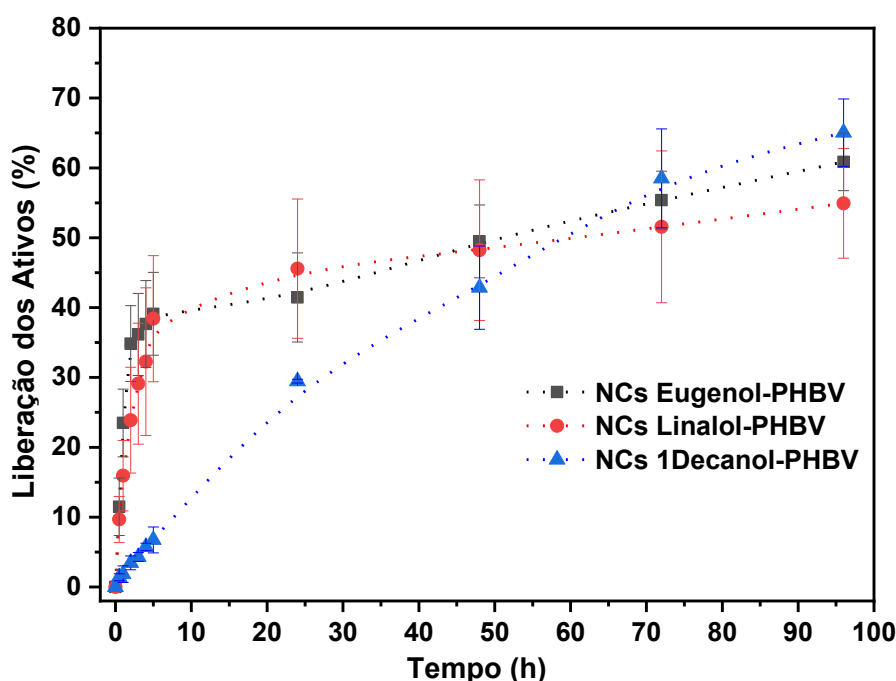
FONTE: O autor (2021)

A cinética de liberação dos compostos a partir das nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose foi determinada pela equação de primeira ordem (Equação 16, p. 146). Para o linalol, os valores da k foram $0,033 \text{ min}^{-1}$ (nanoemulsão de linalol),

0,032 min⁻¹ (nanocápsulas Lin-LbL₁) e Lin-LbL₂ 0,030 min⁻¹ (nanocápsulas Lin-LbL₂). Para o 1-decanol, os valores de k foram 0,032 min⁻¹ (nanoemulsão de 1-decanol), 0,030 min⁻¹ (nanocápsulas 1Dec-LbL₁) e 0,029 min⁻¹ (nanocápsulas 1Dec-LbL₂). Para ambos os compostos, k diminuiu com a deposição de camadas de polímeros sobre as nanoemulsões, diminuindo a liberação do ativo.

Formulação 5 – nanocápsulas de eugenol, *Formulação 6* – nanocápsulas de linalol e *Formulação 7* – nanocápsulas de 1-decanol, para as três formulações foi utilizando o PHBV como material de parede. Essas formulações foram preparadas utilizando maior homogeneização (15.000 rpm), menor concentração de polímero (2 mg mL⁻¹) e maior massa dos ativos (35 mg) testadas durante o desenvolvimento desse trabalho. Da mesma forma que para as nanocápsulas anteriores, as liberações *in vitro* do eugenol, linalol e 1-decanol foram realizadas utilizando água purificada com polisorbato 80 (1,5% m V⁻¹) a 25 °C. A concentração dos ativos liberados das nanocápsulas foi expressa em porcentagem de eugenol, linalol ou 1-decanol total disponível, calculadas por meio das curvas de calibração e plotadas em função do tempo. O perfil de liberação para os ativos a partir das nanocápsulas de PHBV encontram-se na FIGURA 55.

FIGURA 55 - PERFIL DE LIBERAÇÃO PARA (-■-) EUGENOL (-●-) LINALOL E (-▲-) 1-DECANOL APARTIR DAS NANOCÁPSULAS DE PHBV



FONTE: O autor (2021)

O comportamento de liberação dos compostos linalol, 1-decanol e eugenol a partir das nanocápsulas de PHBV foi determinada pela equação de primeira ordem (Equação 16, p. 146). Para o eugenol e linalol o valor de k foi de $0,029 \text{ min}^{-1}$ e para o 1-decanol foi de $0,028 \text{ min}^{-1}$. Esses valores indicam que as nanocápsulas de PHBV promovem uma liberação mais lenta quando comparadas com as nanocápsulas de quitosana.

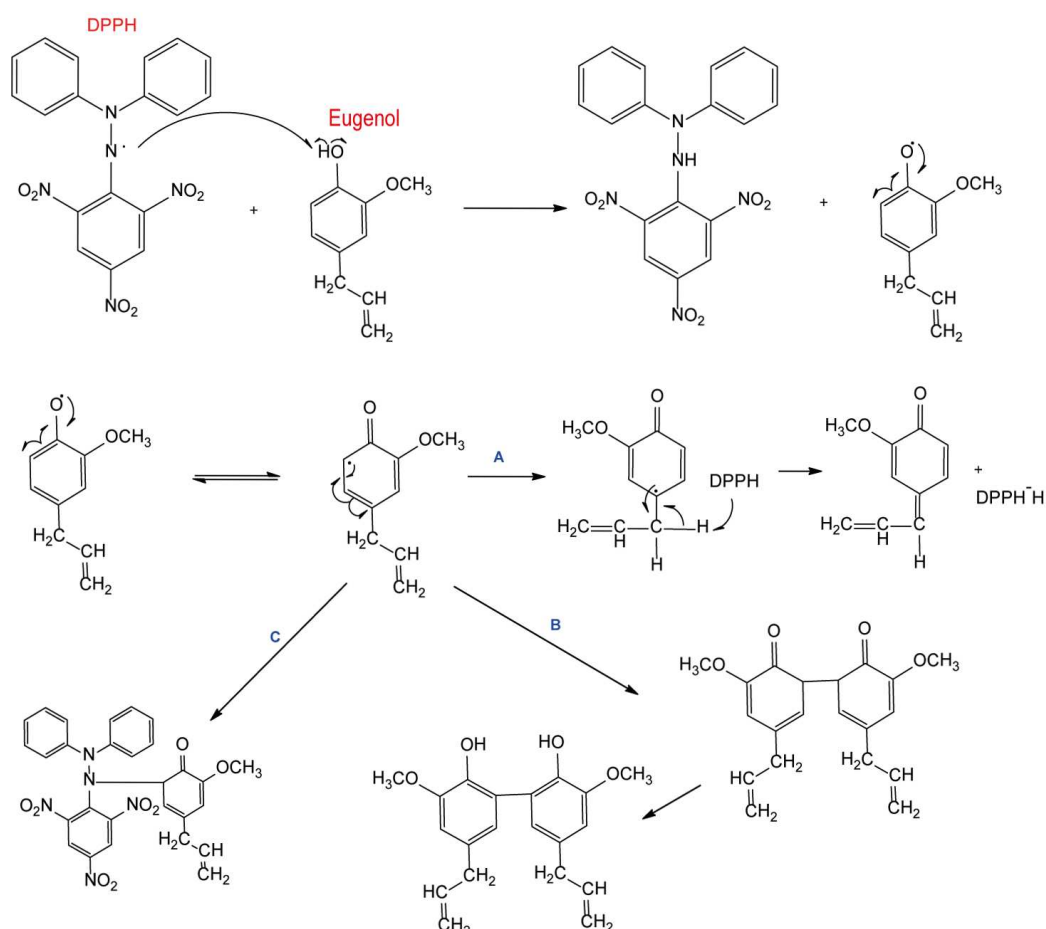
4.5.3. Determinação da atividade antioxidante

Formulações 2, 3, 4, 5, 6 e 7

A atividade antioxidante do eugenol, nanoemulsão de eugenol, nanocápsulas na ausência e na presença do eugenol foi investigada pelo método de sequestro do radical DPPH $^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Esse método consiste em mensurar a atividade antioxidante de uma determinada substância por meio de sua capacidade em reduzir o radical DPPH $^{\bullet}$. Em outras palavras, esse método consegue mostrar se as substâncias possuem o poder de neutralizar ou eliminar radicais livres e, dessa forma, proteger sistemas biológicos frente a oxidação (MAHBOUB; MEMMOU, 2015). Quanto mais rápida a reação entre o composto e o radical livre e maior a quantidade de radical reduzido por molécula antioxidante, maior o poder antioxidante da substância.

Na FIGURA 56 encontram-se as reações que podem ocorrer entre o radical DPPH $^{\bullet}$ e o composto eugenol. Inicialmente, o eugenol doa um átomo de hidrogênio da hidroxila fenólica para o radical DPPH $^{\bullet}$, tornando-o uma molécula estável (DPPH-H). Em seguida, o radical formado no eugenol possui baixa energia e pode ressonar no anel aromático. A partir disso, há a hipótese que podem ocorrer alguns tipos de reações, entre elas: a reação com a doação de um segundo hidrogênio a partir da deslocalização de elétrons no grupo para-substituído (A); a reação de dimerização entre dois radicais fenoxila, posteriormente a dimerização e por meio da transferência intramolecular de hidrogênios os dois grupos hidroxilas seriam regenerados podendo novamente reagir com o radical DPPH $^{\bullet}$ (B); e por último, a reação de complexação, em que um radical arila se complexa com uma molécula de DPPH $^{\bullet}$ (C) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

FIGURA 56 - REAÇÕES QUE PODEM OCORRER ENTRE O RADICAL DPPH[•] E O COMPOSTO EUGENOL



FONTE: Adaptado de Brand-Williams *et al.* (1994)

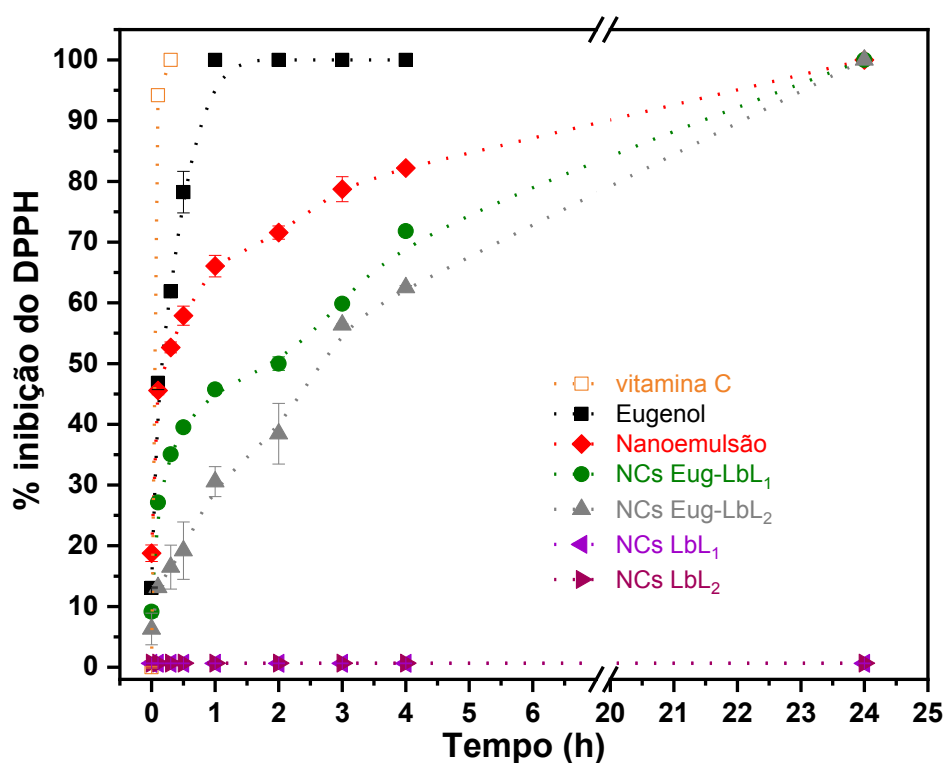
LEGENDA: **A**: reação com a doação de um segundo hidrogênio, **B**: reação de dimerização e **C**: reação de complexação

Após o exposto, pode-se observar a FIGURA 57 que apresenta os resultados da atividade antioxidante do eugenol. A análise se consistiu em monitorar a inibição do DPPH[•] em porcentagem ao longo do tempo, para isso foram avaliados os tempos de 0, 10, 20, 30 min, 1, 2, 3, 4 e 24 h para cada amostra, e fixada as concentrações para eugenol, nanoemulsão e nanocápsulas de eugenol (140,0 µg mL⁻¹) e vitamina C (176,1 µg mL⁻¹). Alguns autores consideram o tempo de reação das substâncias com o DPPH[•] fixo em 30 min. Entretanto, nós observamos que há uma diferença considerável entre o tempo de reação e a ação antioxidante.

Observa-se que o composto livre atinge 100% de inibição em 1 h. As demais amostras atingiram 100% de inibição após 24 h. A nanoemulsão apresentou uma inibição mais rápida quando comparada com as nanocápsulas Eug-LbL₁ e Eug-LbL₂. Dessa forma, nossos experimentos mostram que ao encapsular o ativo ocorre a

redução da atividade antioxidante. Entretanto, também foi possível mostrar que as camadas de polímeros promovem uma proteção do composto e ao adicionar uma segunda camada de polímero a reação com DPPH[•] se torna mais lenta ainda corroborando com nossos resultados da liberação *in vitro*. Outro fator que pode estar influenciando a reação das nanocápsulas é o solvente utilizado para solubilizar o DPPH[•], uma vez que pode modificar a estrutura das nanocápsulas e diminuir a liberação. O controle positivo mostrou 100% de atividade em 10 min, já o controle negativo (água purificada) não apresentou atividade.

FIGURA 57 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH[•] EM DIFERENTES TEMPOS PARA (A) NANOEMULSÃO (B) NANOCÁPSULAS COM UMA CAMADA POLIMÉRICA (Eug-LbL₁) E (C) NANOCAPSULAS COM DUAS CAMADAS POLIMÉRICA (Eug-LbL₂) EM RELAÇÃO AO EUGENOL LIVRE



FONTE: O autor (2021)

Em relação às nanocápsulas na ausência de eugenol (LbL₁ vazia e LbL₂ vazia), não foram observadas atividades de inibição do DPPH[•] consideráveis. Efeitos semelhantes foram observados por Das e colaboradores (2019) e Shao e colaboradores (2018) com nanopartículas de quitosana. Embora alguns autores relatem que a quitosana apresenta atividade antioxidante, a maioria aponta que a atividade da quitosana depende de vários fatores como massa molar e grau de

desacetilação, além da concentração da dispersão polimérica (PARK *et al.*, 2004; KIM; THOMAS 2007; TRUNG; BAO 2015).

Kim e Thomas (2007), observaram que à medida que as concentrações (0,5 a 1,0 % m V⁻¹) e a massa molar (30 a 120 x 10³ g mol⁻¹) da quitosana foram aumentadas, houve uma diminuição da atividade sequestrante do radical DPPH[•], para a massa molar mais alta a atividade inibitória do radical livre situou-se abaixo de 10% e não foi influenciada pela concentração. Os autores sugerem que a quitosana com alta massa molar, quando comparada com quitosana de baixa massa molar apresenta uma menor mobilidade da estrutura, favorecendo interações intra e intermolecular entre as cadeias poliméricas restringindo a exposição dos grupos amino, responsáveis pelo sequestro do radical.

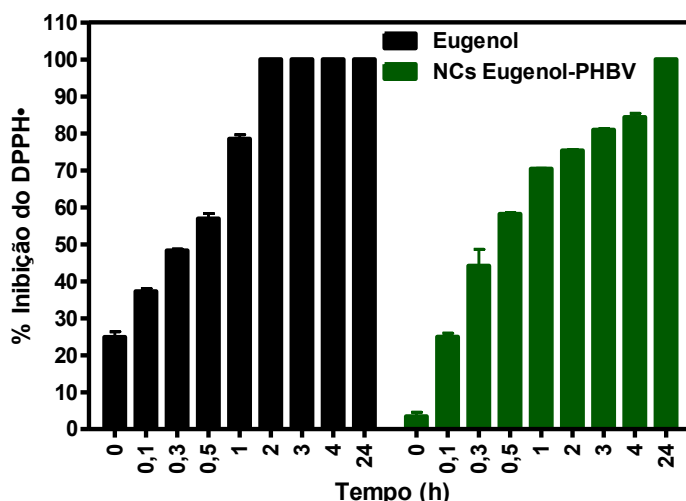
A hipótese de que o grupo amino é responsável pela atividade antioxidante da quitosana em relação ao DPPH[•] também foi relatada por Park e colaboradores (2004). Esses autores observaram que, em uma dispersão de concentração de 5 mg mL⁻¹, quanto maior o grau de desacetilação (90%), maior a atividade antioxidante da quitosana (próximo a 40%). Quando em meio ácido, como por exemplo em ácido acético diluído, o nitrogênio dos grupos amino por meio do seu único par de elétrons livre se liga a um próton liberado da solução ácida para formar os grupos NH₃⁺. Os radicais livres de DPPH[•] podem reagir com o NH₃⁺ para formar uma molécula estável (TRUNG; BAO, 2015).

Neste trabalho, provavelmente grande parte dos grupos aminos da quitosana presente na camada de revestimento estão interagindo ionicamente com a nanoemulsão e os grupos restantes possuem baixa densidade de carga, uma vez que as nanocápsulas foram dispersas em água purificada. Em relação a carboximetilcelulose, os resultados corroboram com os dados de Michelin e colaboradores (2020). Esses autores apontaram que filmes de carboximetilcelulose não demonstraram atividade antioxidante frente ao DPPH[•], apenas quando o polímero foi misturado com porções de lignina, uma vez que essa possui hidroxilas fenólicas que interagem mais facilmente com o radical livre.

As nanocápsulas de PHBV contendo o eugenol e o composto livre também foram avaliadas em relação a inibição do DPPH[•] na concentração de 120,0 µg mL⁻¹. Os resultados encontram-se na FIGURA 58. O comportamento foi semelhante ao observado anteriormente. O eugenol livre promoveu uma inibição mais rápida de 100% do radical após 2 h. As nanocápsulas contendo o ativo alcançam a inibição de

100% apenas 24 h após o início do experimento. A fim de comparação, também foram testadas as nanocápsulas vazias de PHBV, as quais não exerceram inibição do DPPH[•].

FIGURA 58 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH[•] EM DIFERENTES TEMPOS PARA AS NANOCÁPSULAS DE PHBV CONTENDO O EUGENOL EM RELAÇÃO AO ATIVO LIVRE



FONTE: O autor (2021)

A atividade antioxidante das amostras também foi avaliada pelo método de ABTS^{•+}. As amostras foram analisadas após 2 h de reação e os resultados expressos em mmol de Trolox por grama de amostra (mmol ET g⁻¹) encontram-se na TABELA 26. Como se observa o eugenol livre apresenta a maior atividade antioxidante em relação ao ABTS^{•+}, seguida da nanoemulsão, nanocapsulas Eug-LbL₁ e Eug-PHBV, e por fim as nanocápsulas Eug-LbL₂. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pelo método do DPPH[•].

Para os compostos linalol e 1-decanol foram observados comportamentos diferentes (FIGURA 59). Tanto os compostos como as nanoemulsões apresentaram uma baixa inibição do DPPH[•] em relação ao tempo nas concentrações de 160,0 µg mL⁻¹ para o linalol e 180,0 µg mL⁻¹ para o 1-decanol. Em vista disso, não foram realizados os experimentos para as nanocápsulas.

Existem algumas hipóteses para essa baixa atividade antioxidante de ambos os compostos. Quando comparado com o eugenol, por ele possuir uma hidroxila fenólica, quando a ligação O-H é clivada, ocorre a formação de uma radical de baixa energia que se deslocaliza por meio de ressonância no anel aromático. Para os

compostos linalol e 1-decanol esse processo não ocorre, justificando assim suas menores atividades antioxidantes.

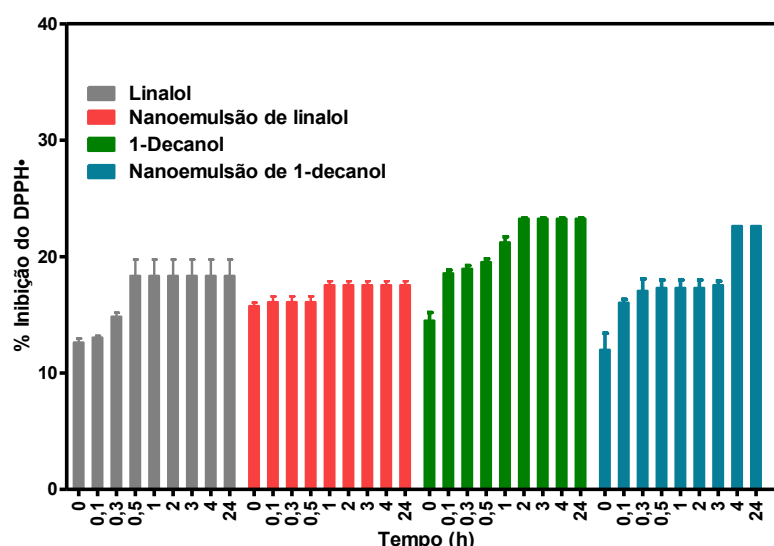
TABELA 26 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EUGENOL, NANOEMULSÃO DE EUGENOL, NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁, NANOCÁPSULAS Eug-LbL₂, NANOCÁPSULAS Eug-PHBV VIA ENSAIOS ANTIOXIDANTES ABTS*+

Amostra	mmol ET g ⁻¹
Eugenol	9,5 ± 0,20
Nanoemulsão de eugenol	8,8 ± 0,02
NCs Eug-LbL ₁	5,2 ± 0,08
NCs Eug-LbL ₂	2,2 ± 0,11
NCs Eug-PHBV	4,3 ± 0,30

FONTE: O autor (2021)

Na literatura há relatos de que óleos essenciais contendo o linalol como composto majoritário possuem boa atividade antioxidante. Entretanto, quando o composto isolado é analisado sua atividade antioxidante decresce consideravelmente (DUARTE *et al.*, 2016).

FIGURA 59 - VALORES DE INIBIÇÃO DO DPPH EM DIFERENTES TEMPOS PARA A (A) NANOEMULSÃO (B) NANOCÁPSULAS COM UMA CAMADA POLIMÉRICA (Lin-LbL₁) E (C) NANOCAPSULAS COM DUAS CAMADAS POLIMÉRICA (Lin-LbL₂) EM RELAÇÃO AO LINALOL



FONTE: O autor (2021)

Apesar do 1-decanol ser um composto conhecido, sua atividade antioxidante não é muito explorada. Eom e colaboradores (2017) mostraram que o 1-decanol na

concentração de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresenta atividade antioxidante em relação ao DPPH* menor que 20%. Entretanto, não se pode descartar problemas experimentais que atribuam atividade antioxidante a tais compostos.

Diante disso e com base na literatura, pode-se afirmar que o eugenol é o composto com melhor atividade antioxidante, além disso o seu revestimento com polímeros oferece uma mudança na cinética da atividade antioxidante, permitindo sua atividade por um período maior, corroborando com os dados de cinética de liberação apresentados anteriormente.

4.5.4. Propriedades de superfícies

Formulação 2

Filmes poliméricos e nanocápsulas podem ser usados para revestir produtos como frutas e vegetais, aumentando a vida útil desses alimentos (ZAMBRANO-ZARAGOZA *et al.*, 2018), além disso esses filmes e nanocápsulas podem proporcionar a liberação de ativos para proteção contra patógenos.

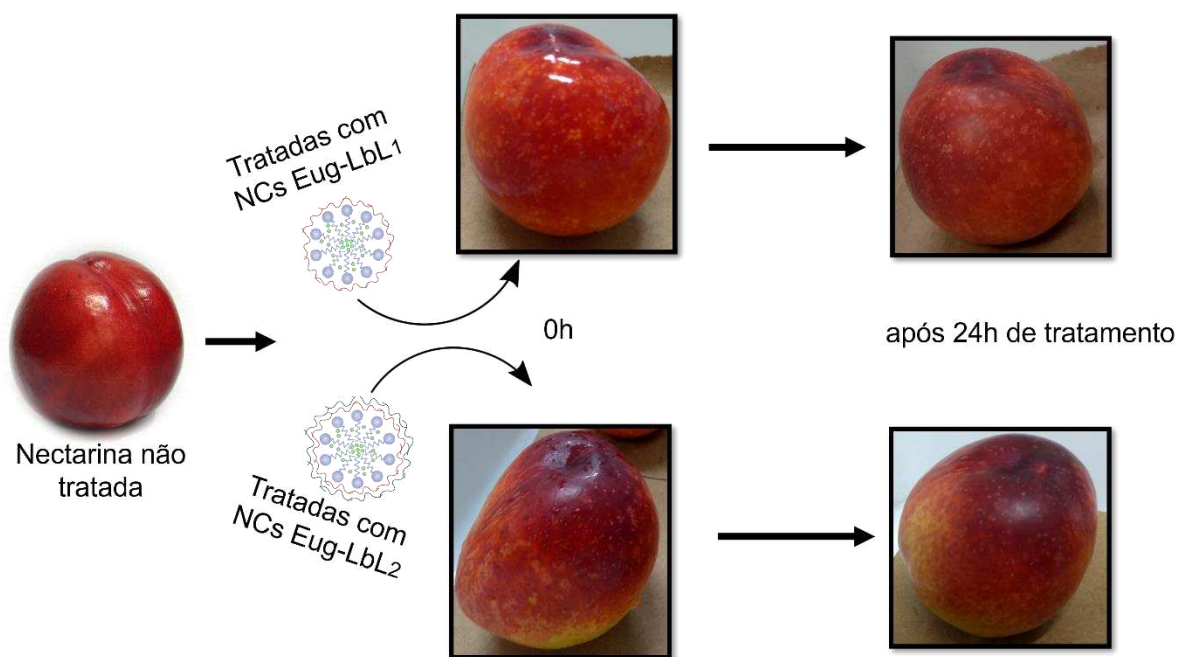
Para analisar os efeitos das nanocápsulas sobre as nectarinas e obter as propriedades de superfície, os frutos foram tratados com água purificada (controle), nanocápsulas Eug-LbL₁ e Eug-LbL₂. Os aspectos macroscópicos dos revestimentos promovidos pelas nanocápsulas podem ser vistos na FIGURA 60. Percebe-se uma aparência homogênea e transparente, não sendo possível observar diferenças acentuadas em relação para a amostra de controle.

Em seguida, foram realizadas as medidas de ângulo de contato da nectarina e da superfície dos filmes presentes nas nectarinas. Os ângulos de contato das nectarinas não tratadas (controle) e tratadas com as nanocápsulas na presença de eugenol (Eug-LbL₁₋₂) e nanocápsulas na ausência de eugenol (LbL₁₋₂ vazias), foram obtidos utilizando três líquidos de polaridades diferentes (água, formamida e diiodometano) e podem ser vistos na FIGURA 61.

Quando a gota de líquido entra em contato com a superfície da amostra (nectarina), interações intermoleculares são estabelecidas entre a superfície do epicarpo ou a superfície do filme e a gota do líquido que podem ser forças de atração ou repulsão. Assim, considerando um líquido polar, quanto maior o ângulo de contato, menor a afinidade da superfície em questão com o líquido, ou seja, mais hidrofóbica

essa superfície é e menos molhável. Isso pode ser observado para a amostra controle (FIGURA 61) quando em contato com os líquidos água e formamida ($p < 0,05$).

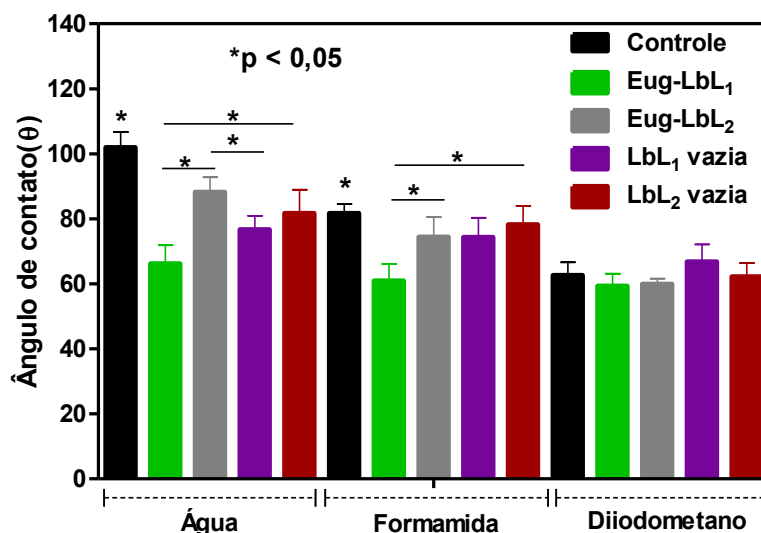
FIGURA 60 - ASPECTOS VISUAIS DOS TRATAMENTOS REALIZADOS SOBRE A NECTARINA COM: CONTROLE (ÁGUA), NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁ E NANOCÁPSULAS Eug-LbL₂



FONTE: O autor (2021)

Por outro lado, os ângulos de contato das amostras tratadas com as nanocápsulas, para os líquidos água e formamida, diminuem em relação à amostra controle aumentando a molhabilidade ($p < 0,05$). Nas amostras com as nanocápsulas Eug-LbL₁ (quitosana), houve uma maior molhabilidade em relação às demais amostras, isso pode estar relacionado à melhor interação dos grupos acetil da quitosana com a nectarina, tornando os grupos hidrofílicos da quitosana mais expostos. No caso do revestimento com a segunda camada de polímero (carboximetilcelulose), essa diminuição não é tão acentuada, isso pode estar relacionado a um revestimento incompleto, pois a carboximetilcelulose tem caráter hidrofílico, portanto menor afinidade com a nectarina. Com exceção do diodometano possivelmente devido sua baixa polaridade, esses dados nos mostram que as amostras têm um efeito “zig-zag”, o que sugere que a deposição alternada das camadas de polímero foi bem-sucedida.

FIGURA 61 - VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO (n = 6) DOS ÂNGULOS DE CONTATO (θ) DOS LÍQUIDOS ÁGUA, FORMAMIDA E DIODOMETANO PARA NECTARINAS NÃO TRATADAS (CONTROLE) E TRATADAS COM NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DE EUGENOL (Eug-LbL₁₋₂) E NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (LbL₁₋₂ vazias)



FONTE: O autor (2021)

Com os valores dos ângulos de contato obtidos para todos os líquidos, foi possível calcular a energia livre de superfície da amostra controle e dos revestimento da nectarina baseado no método descrito por Van Oss e colaboradores (1988) e Da Silva e colaboradores (2020) usando o modelo Lifshitz-van der Waals/Lewis ácido-base (LWAB) para calcular os componentes da tensão superficial de superfícies sólidas. O cálculo foi realizado usando a Equação 17 e a TABELA 27 que contém os valores das componentes energéticas dos líquidos utilizados pelo *software* SCA20.

$$\gamma(1 + \cos\theta_c) = 2 \left[\left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} \right) + (\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-}) + (\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}) \right] \quad (\text{Eq. 17})$$

em que θ_c é o ângulo de contato experimental, γ é a tensão superficial total, γ^{LW} é a componente Lifshitz-van der Waals (dispersiva), γ^+ e γ^- (polar) são os componentes de tensão superficial ácido e base de Lewis. Os subscritos S e L representam sólido e líquido, respectivamente.

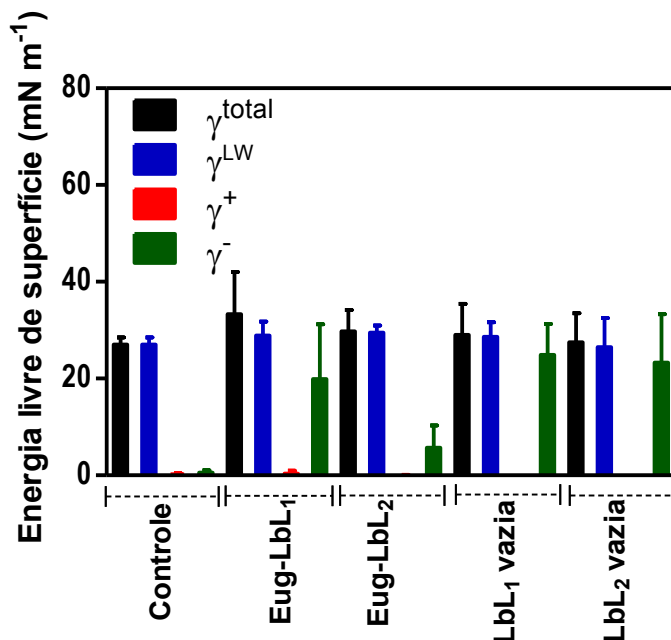
TABELA 27- VALORES DE TENSÃO SUPERFICIAL TOTAL (γ^{total}) E DAS COMPONENTES DISPERSIVAS (γ^{LW}), POLAR (γ^{AB}), ÁCIDA (γ^+) E BÁSICA (γ^-) DO MODELO LWAB PARA OS LÍQUIDOS ÁGUA, FORMAMIDA E DIODOMETANO

Líquidos	$\gamma^{\text{total}}/\text{mN m}^{-1}$	$\gamma^{\text{LW}}/\text{mN m}^{-1}$	$\gamma^+/\text{mN m}^{-1}$	$\gamma^-/\text{mN m}^{-1}$	$\gamma^{\text{AB}}/\text{mN m}^{-1}$
Água	72,8	21,8	25,5	25,5	51,0
Formamida	58,0	33,0	3,2	48,1	9,9
Diodometano	50,8	0,0	0,0	0,0	50,8

FONTE: Base de dados do *software* SCA20.

Os valores referentes a energia livre de superfície e suas respectivas componentes dispersiva e polar para a amostra controle, nanocápsulas na presença de eugenol (Eug-LbL₁₋₂) e nanocápsulas na ausência de eugenol (LbL₁₋₂) calculadas pelo modelo LWAB, podem ser observados na FIGURA 62. A amostra controle apresentou menor valor de energia livre de superfície ($27 \pm 1,5 \text{ mN m}^{-1}$). Como a superfície da nectarina foi modificada com os nanocápsulas Eug-LbL₁, houve um aumento da energia livre de superfície, possivelmente relacionado ao melhor revestimento ($35,3 \pm 3,5 \text{ mN m}^{-1}$). O revestimento com as nanocápsulas Eug-LbL₂ acarretou uma diminuição da energia livre superficial, muito próximo à superfície sem tratamento ($29,1 \pm 3,5 \text{ mN m}^{-1}$). Além disso, por meio de análises estatísticas, foi confirmado que existe uma diferença considerável ($p < 0,05$) entre as amostras tratadas e não tratada. A mesma tendência foi observada para os componentes dispersiva (Lifshitz-van der Waals) e polar (ácido/base de Lewis). Isso permite inferir que a amostra de controle tem uma superfície menos polar. No caso das amostras com revestimentos de quitosana tanto com nanocápsulas na presença como na ausência de eugenol, observa-se valores da componente polar diferentes do esperado. A presença da componente polar básica (γ^-) está mais evidenciada, supostamente porque ao secar as amostras para a análise, a quitosana que reveste a nanoemulsão pode ter modificado o revestimento, abrindo espaços na camada polimérica depositada, e, dessa forma, expõe os grupos iônicos do lauril sulfato de sódio. Em adição, as lavagens para remover os excessos de polímero e composto ativo que não reagiram, podem ter neutralizado às cargas da quitosana. Já para as nanocápsulas Eug-LbL₂ e LbL₂ vazias os resultados com maior componente γ^- podem ser devido à presença da carboximetilcelulose como segunda camada polimérica. Além disso, foi observado que ao somar as componentes dispersivas e polares não há diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação a energia livre de superfície para todas as amostras analisadas.

FIGURA 62 - (A) ENERGIA LIVRE DE SUPERFÍCIE (γ^{total}), COMPONENTES DE Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) E ÁCIDA (γ^+) E BÁSICA (γ^-) OBTIDAS PELO MODELO LWAB PARA AS AMOSTRAS CONTROLE E NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE EUGENOL



FONTE: O autor (2021)

Com os dados calculados de energia livre de superfície, foi possível obter o trabalho de adesão (W_a) do revestimento das nanocápsulas em nectarinas. Os trabalhos de adesão foram calculados usando as Equações 18, 19 e 20.

$$W_a = W_a^{AB} + W_a^{LW} \quad (\text{Eq. 18})$$

$$W_a^{AB} = 2 \left[\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} \right) \right] \quad (\text{Eq. 19})$$

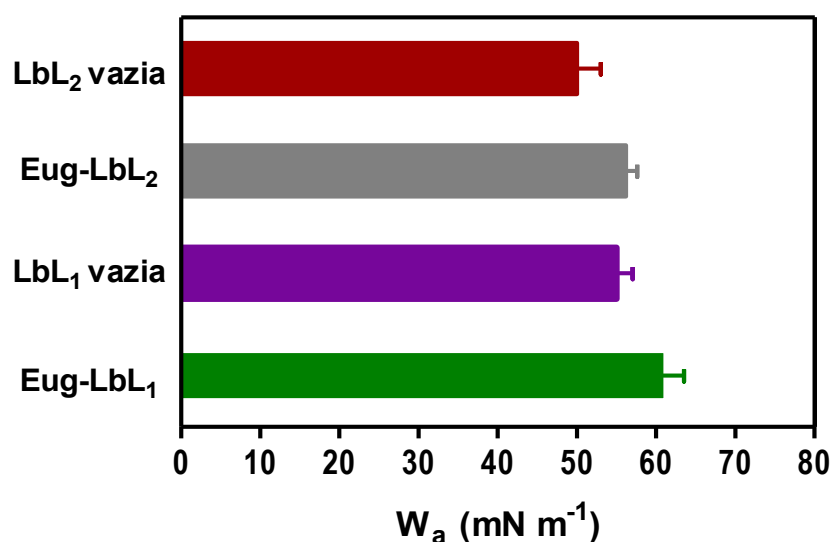
$$W_a^{LW} = 2 \left[\left(\sqrt{\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW}} \right) \right] \quad (\text{Eq. 20})$$

onde W_a é o trabalho de adesão total, W_a^{AB} é o componente de trabalho de adesão ácido-base de Lewis, W_a^{LW} é o trabalho de adesão Lifshitz-van der Waals. Os subscritos 1 e 2 significam a superfície sólida 1 e a superfície sólida 2, respectivamente.

O trabalho de adesão sólido-sólido (epicarpo da nectarina-filme de nanocápsulas) foi determinado usando o modelo LWAB e pode ser visto na FIGURA 63. Observa-se que houve diferença entre o trabalho de adesão dos tratamentos com as nanocápsulas Eug-LbL₁ e Eug-LbL₂ ($p < 0,05$).

As nectarinas tratadas com nanocápsulas de quitosana apresentam maior trabalho de adesão e, portanto, melhor adesão do filme à nectarina, isto se deve à quitosana apresentar uma tendência mais hidrofóbica (presença de alguns grupos acetil) do que a carboximetilcelulose e, portanto, mais compatível com a superfície da nectarina. No caso das amostras tratadas com nanocápsulas Eug-LbL₂, a carboximetilcelulose tem características mais hidrofílicas que a quitosana, portanto, pode ocorrer menor interação com a superfície da nectarina. Além disso, a liberação do eugenol das nanocápsulas também pode estar associada aos fenômenos observados, uma vez que para as nanocápsulas na ausência do ativo (LbL₁₋₂ vazias) os trabalhos de adesão observados foram menores do que para as nanocápsulas na presença do eugenol (Eug-LbL₁₋₂).

FIGURA 63 - TRABALHO DE ADESÃO (W_a) DAS NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EUGENOL SOBRE AS NECTARINAS



FONTE: O autor (2021)

Conforme observado nos testes *in vitro*, o eugenol é liberado mais rapidamente das nanocápsulas Eug-LbL₁ e possivelmente interage com a nectarina devido a maior afinidade com os componentes da cera epicuticular da superfície do fruto, melhorando a adesão das nanocápsulas sobre a nectarina. Para as

nanocápsulas Eug-LbL₂, esse processo pode ocorrer mais lentamente devido a liberação mais lenta em comparação com as nanocápsulas Eug-LbL₁ observado na liberação *in vitro* anteriormente.

4.6. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

4.6.1. Ensaios de atividade antimicrobiana - *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp e *Candida albicans*

Nesta parte do trabalho, os ensaios antimicrobianos foram realizados com a Formulação 1 - nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo eugenol.

A potencial atividade antifúngica das nanocápsulas foi investigada frente aos fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp e levedura *Candida albicans* por 48 h. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) são mostrados na TABELA 28. No presente estudo, o eugenol apresentou CIM de 200,0 e 400,0 µg mL⁻¹ para fungos filamentosos e *Candida albicans*, respectivamente. Os valores da CIM para cápsulas foram expressos em relação à concentração do eugenol (TABELA 28). Para todos os fungos, a concentração de eugenol nas cápsulas necessárias para a atividade inibitória é menor do que a necessária para o eugenol livre. As nanocápsulas foram mais eficazes para inibir o crescimento de *Gliocladium* sp e *Candida albicans*, e foi observada uma atividade antifúngica melhorada, independentemente do número de camadas de polímero. A atividade antifúngica contra os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp foi observada com a deposição de até três camadas de polímeros. Após a adição da quarta camada, as microcápsulas perderam suas atividades.

Além disso, a atividade antifúngica dos precursores lauril sulfato de sódio, nanoemulsão Eugenol-LSS, quitosana e carboximetilcelulose também foi avaliada (TABELA 28). O lauril sulfato de sódio apresentou atividade inibitória para todos os fungos, o que pode ser atribuído à interrupção das paredes celulares do fungo já observada em literatura (PANÁČEK *et al.*, 2009). Além disso, quando associado ao eugenol, o lauril sulfato de sódio (nanoemulsão Eugenol-LSS) exibiu um efeito sinérgico que aumenta a inibição dos fungos. A nanoemulsão Eugenol-LSS libera o agente mais rapidamente e, dessa forma, o ativo se difunde rompendo as membranas celulares dos fungos, resultando na inibição mais eficaz desses patógenos (BILIA *et*

al., 2014; LI *et al.*, 2015). Além disso, há também a presença de eugenol que não foi incorporado, que é liberado no meio.

TABELA 28 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) DO Eugenol, NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS CONTENDO Eugenol, NANOEMULSÃO Eugenol-LSS, LAURIL SULFATO DE SÓDIO, QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE FRENTE AOS FUNGOS *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp E *Candida albicans* APÓS 48 h

Amostras	<i>Aspergillus</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Candida</i>
	<i>niger</i>	sp	sp	<i>albicans</i>
Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$)				
Eugenol	200,0	200,0	200,0	400,0
* NCs Eugenol-LbL ₁	133,4	133,4	33,3	8,3
* NCs Eugenol-LbL ₂	118,2	118,2	29,5	14,7
* NCs Eugenol-LbL ₃	115,7	115,7	28,9	28,9
* MCs Eugenol-LbL ₄	-	-	103,5	51,7
* MCs Eugenol-LbL ₅	-	-	91,6	91,6
* Nanoemulsão Eugenol-LSS	12,5	25,0	12,5	6,3
Lauril sulfato de sódio	90,1	90,1	45,1	22,5
Quitosana	-	-	62,5	250,0
Carboximetilcelulose	-	-	-	250,0

FONTE: O autor (2021)

*os valores da CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em função da concentração de eugenol foram obtidos a partir de ensaios em duplicata, sem diferença entre os resultados.

Os polímeros também podem exibir atividade antimicrobiana, dependendo dos fungos testados. A quitosana apresentou atividade antifúngica para os fungos *Gliocladium* sp e *Candida albicans*, enquanto a carboximetilcelulose foi ativa apenas contra *Candida albicans*. Assim, o surfactante e os polissacarídeos também podem ser importantes para a atividade antifúngica exibida pelos sistemas desenvolvidos no presente estudo. O controle mais efetivo dos fungos foi observado para *Candida albicans*. Isso pode estar relacionado ao melhor sinergismo dos componentes do sistema, porque todos os precursores apresentaram atividade inibitória para esse patógeno.

Em linhas gerais, além dos fatores acima mencionado a atividade antifúngica da nanomulsão e das nanocápsulas na presença de eugenol pode ser relacionada com a liberação do eugenol das nano e microcápsulas observadas nos ensaios *in vitro*. Visto que a avaliação contra os fungos foi realizada no período de 48 h, as nanocápsulas com menor número de camadas de revestimento liberam mais rapidamente o ativo e, por isso, podem exercer uma atividade mais eficiente contra os

fungos do que as microcápsulas. O mesmo pode ser observado para a nanoemulsão que libera o ativo rapidamente.

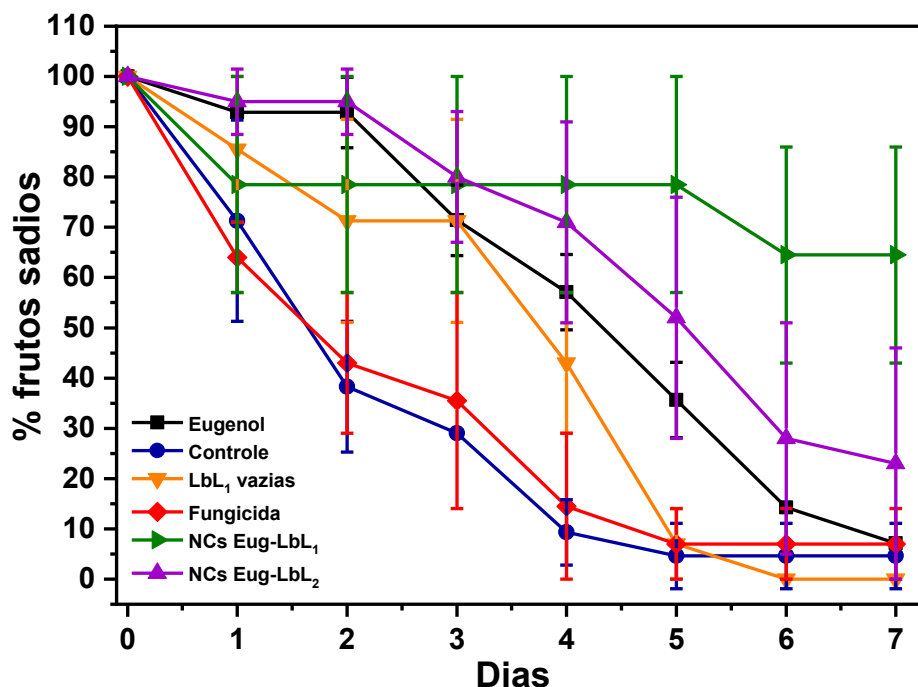
Neste sentido, a atividade antifúngica principalmente da nanoemulsão e das nanocápsulas, mostra resultados promissores quanto à viabilidade do uso do eugenol como fungicida natural.

4.6.2. Ensaios *ex vivo* para o controle de *Monilinia fructicola*

Nesta etapa, foi avaliada a atividade antimicrobiana das nanocápsulas com até duas camadas de polímeros (Eug-LbL₁₋₂) (Formulação 2) em comparação com um fungicida usualmente empregado para o controle do *Monilinia fructicola*, amostras controle e solução aquosa de eugenol. Os experimentos foram realizados na safra 2018/2019, utilizando nectarinas saudáveis no período de pós-colheita. A solução aquosa de eugenol foi utilizada na concentração de 780 mg L⁻¹ de acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa e as nanocápsulas com concentrações de 62,4 mg L⁻¹ (Eug-LbL₁) e 41,1 mg L⁻¹ (Eug-LbL₂). O iprodiona, fungicida organoclorado, foi utilizado na concentração recomendada para aplicação em campo (100,0 mg L⁻¹).

A FIGURA 64 apresenta a avaliação da proporção de frutos sadios (diferentes tratamentos) em relação ao tempo de 7 dias. O iprodiona perdeu sua ação inibitória nos frutos rapidamente, enquanto a solução aquosa de eugenol foi mais eficiente e minimizou o aparecimento da podridão parda nos frutos. No caso das nanocápsulas, o processo de encapsulação do eugenol promoveu o controle do fungo por mais tempo e com menor quantidade de eugenol, uma vez que a eficiência de incorporação do primeiro revestimento polimérico foi próxima a 8,3%. À medida que foi adicionada uma segunda camada de polímero, houve uma diminuição na inibição do patógeno. Isso pode estar relacionado ao fato de que sistemas com maiores velocidades de liberação podem controlar o fungo de forma mais eficiente e por este motivo, os nanocápsulas de Eug-LbL₁ apresentaram a melhor atividade fungicida ($p < 0,05$). As nanocápsulas na ausência de eugenol (LbL₁ vazias) conseguem controlar o fungo ao nível do fungicida iprodiona. Essa observação é importante, pois apenas as nanocápsulas LbL₁ vazias já seriam suficientes para manter os frutos sadios por mais tempo.

FIGURA 64 - TESTE DE INIBIÇÃO DO PATÓGENO *Monilinia fructicola* EM NECTARINAS POR PERÍODO DE 7 DIAS UTILIZANDO (-■-) SOLUÇÃO AQUOSA DE EUGENOL, (-♦-) IPRODIONA, (-●-) CONTROLE, (-▼-) NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (LbL₁ vazias), (-►-) NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DE EUGENOL Eug-LbL₁ E (-▲-) Eug-LbL₂



FONTE: O autor (2021)

Notavelmente, o eugenol encapsulado em nanocápsulas com uma camada de quitosana apresenta uma diferença considerável ($p < 0,05$), mesmo no sétimo dia de avaliação em relação aos demais tratamentos. As imagens dos experimentos contendo todos os tratamentos durante os 7 dias, podem ser observados na FIGURA A12 (Apêndice).

O controle efetivo dos tratamentos com nanocápsulas pode estar relacionado ao revestimento que as nanocápsulas promovem na superfície das nectarinas, este revestimento fornece uma barreira contra elementos externos, além de proteger contra a perda de umidade (ELSABEE; ABDOL, 2013). O melhor resultado observado para nanocápsulas com uma camada polimérica também pode estar associado à sua maior aderência à superfície da nectarina, conforme demonstrado nos resultados obtidos no trabalho de adesão. Essa melhor aderência das nanocápsulas Eug-LbL₁ à nectarina, além de proteger contra o fungo, pode evitar a perda de água e, assim, manter a qualidade do fruto.

Outro fator que pode estar associado ao melhor desempenho das nanocápsulas revestidas com quitosana é a sua carga positiva de superfície (potencial

ζ : 32 ± 5 mV) que pode interagir com a carga negativa dos fosfolipídios da membrana fúngica. Essa interação aumenta a permeabilidade na membrana ocasionando perda do conteúdo celular e levando à morte do fungo (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004). Além disso, o tamanho das nanocápsulas também pode estar relacionado à melhor atividade antifúngica, pois ao reduzir o tamanho, a área de superfície de contato aumenta, promovendo uma melhor afinidade com as células fúngicas (ING *et al.*, 2012).

Dessa forma, considerando os fatores que influenciam a atividade antimicrobiana, as nanocápsulas contendo eugenol com apenas uma camada de quitosana (Eug-LbL₁) e as nanocápsulas na ausência do eugenol (LbL₁ vazias) podem ser uma alternativa potencial para o recobrimento de frutas, permitindo a preservação por períodos mais longos, além de utilizar substâncias naturais muito menos tóxicas que os fungicidas.

4.6.3. Ensaios de atividade antimicrobiana - *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Nesta parte do trabalho, foram realizados ensaios antimicrobianos com as nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol (Formulação 3) ou 1-decanol (Formulação 4), nanocápsulas de PHBV contendo eugenol (Formulação 5), linalol (Formulação 6) ou 1-decanol (Formulação 7).

A potencial atividade antifúngica e antibacteriana dos compostos livres, das nanoemulsões, das nanocápsulas contendo os ativos e das nanocápsulas na ausência dos ativos foi avaliada frente aos fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os valores foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento do micro-organismo pelo logaritmo da concentração dos compostos puros ou presentes nas nanoemulsões e nas nanocápsulas. Os valores de inibição do crescimento para os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* utilizando os compostos linalol e 1-decanol livres e encapsulados em quitosana e carboximetilcelulose podem ser observados nas FIGURAS 65 e 66. Além disso, os valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀), os respectivos erros e coeficiente de determinação (R²) podem ser observados na TABELA 29.

Os controles positivos de amoxicilina para a *Staphylococcus aureus* e trimetropina para a *Escherichia coli* foram eficientes nas concentrações de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já para o fungo *Aspergillus niger* e a levedura *Candida albicans* foi utilizada a cicloheximida como controle positivo, com efeito inibitório acima da concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ao adicionar as nanocápsulas aos micro-organismos, a taxa de crescimento destes foi afetada negativamente, causando uma redução na absorbância máxima da mistura. Em geral, o 1-decanol foi composto que mais influenciou no crescimento de todos os micro-organismos testados independente das nanocápsulas utilizadas, de quitosana e carboximetilcelulose ou de PHBV.

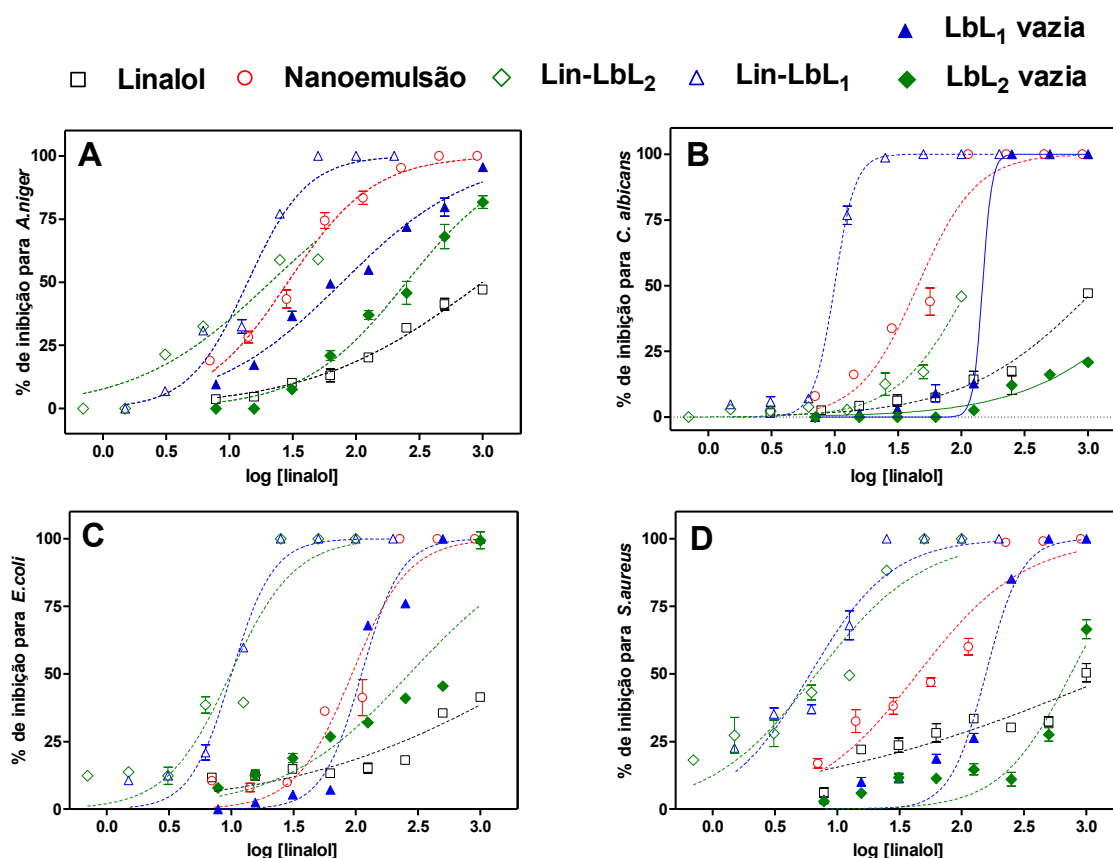
Alguns trabalhos relataram atividade antimicrobiana (CIM $4300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) do linalol contra bactérias. Gao e colaboradores (2019) descreveram o mecanismo de ação desse composto contra a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*, responsável por contaminar alimentos e provocar intoxicações alimentares graves. Evidenciaram as alterações na estrutura celular e nos componentes celulares, tanto dentro quanto na superfície das células, após o tratamento com o linalol.

Neste trabalho, é possível observar que o linalol livre apresentou baixa inibição para todos os micro-organismos, situando-se próximo a 50% para a concentração mais alta, sendo o CI_{50} acima de $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após os processos de emulsificação e nanoencapsulação, essas atividades foram melhoradas. A nanoemulsão de linalol apresentou melhor inibição para a *Aspergillus niger* com CI_{50} de $28,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. As nanocápsulas de linalol com a camada externa de quitosana apresentaram inibição de 100,0% para todos os patógenos, com maior eficiência para o *Candida albicans* (CI_{50} : $9,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a *Staphylococcus aureus* (CI_{50} : $6,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por outro lado, as nanocápsulas de linalol com a camada externa de carboximetilcelulose mostraram melhor atividade para as duas bactérias *Escherichia coli* (CI_{50} : $9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Staphylococcus aureus* (CI_{50} : $6,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto, quando comparadas com as nanocápsulas na ausência de linalol percebe-se que a atividade antimicrobiana pode ser diminuída, possivelmente devido ao efeito de superfície que sistemas em escala nano, mesmo na ausência de ativos, podem exercer.

Em relação as nanocápsulas na ausência dos ativos e frente ao fungo filamentoso *Aspergillus niger*, nenhuma nanocápsula alcançou 100,0% de inibição de crescimento do micro-organismo. As nanocápsulas LbL₁ e LbL₂ vazias tiveram maior desempenho, 92,5% e 89,9%, respectivamente. Já quando analisado o crescimento

da levedura *Candida albicans* na presença das nanocápsulas vazias, foi obtido resultado de maior atividade inibitória para as nanocápsulas LbL₁ vazia (100,0%) seguida da LbL₂ vazia (15,4%). A baixa atividade das nanocápsulas LbL₂ vazias pode estar relacionada ao polímero carboximetilcelulose, presente na obtenção dessas nanocápsulas, assim reduzindo o efeito da quitosana que possui maior atividade antifúngica (HU *et al.*, 2016). As nanocápsulas vazias (LbL₁ e LbL₂ vazias) também mostraram atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, decrescendo com o aumento da diluição das amostras.

FIGURA 65 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS MICRO-ORGANISMOS (A) *Aspergillus niger*, (B) *Candida albicans*, (C) *Escherichia coli* E (D) *Staphylococcus aureus* EM RELAÇÃO AOS TARAMENTOS COM NANOEMULSÃO CONTENDO LINALOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA PRESENÇA DE LINALOL (Lin-LbL₁ e Lin-LbL₂) E NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE LINALOL (LbL₁ e LbL₂ vazias)

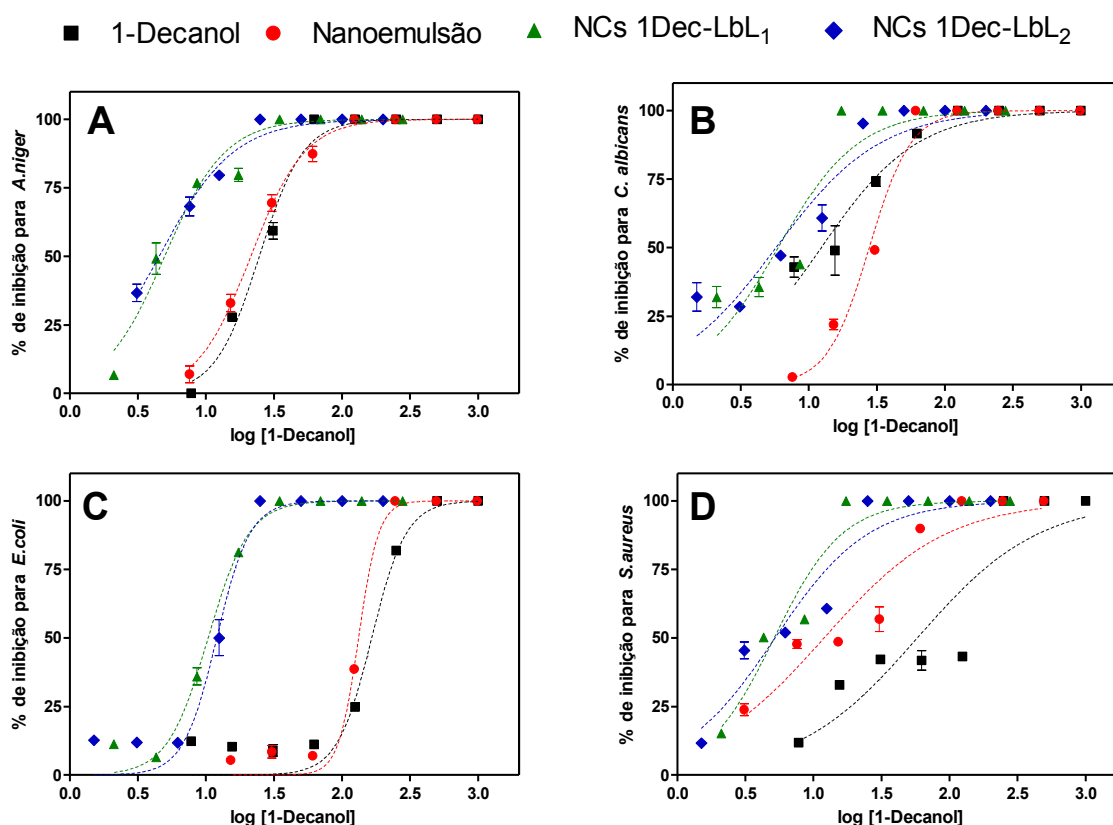


FONTE: O autor (2021)

Para o 1-decanol (FIGURA 66) a inibição ocorre mais eficientemente para a maior parte das amostras testadas. O composto puro exibe atividade de inibição com CI_{50} de 12,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Candida albicans*, 24,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o *Aspergillus niger*,

58,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Staphylococcus aureus* e 165,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Escherichia coli*. A nanoemulsão se mostrou mais eficiente frente a bactéria *Staphylococcus aureus* (CI_{50} : 11,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) seguido pelos fungos *Candida albicans* (CI_{50} : 21,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Aspergillus niger* (CI_{50} : 27,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Enquanto as nanocápsulas contendo o ativo tanto 1Dec-LbL₁ quanto 1Dec-LbL₂ mostraram excelentes atividades de controle de todos os micro-organismos com CI_{50} abaixo de 12,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FIGURA 66 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS MICRO-ORGANISMOS (A) *Aspergillus niger*, (B) *Candida albicans*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Staphylococcus aureus* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM 1-DECANOL, NANOEMULSÃO CONTENDO 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA PRESENÇA DE 1-DECANOL (1Dec-LbL₁ E 1Dec-LbL₂)



FONTE: O autor (2021)

Para ambas as bactérias avaliadas, quando subtraída a atividade de crescimento exercida pelas nanocápsula contendo o ativo da atividade de crescimento ocasionada pelas nanocápsula na ausência do ativo, os melhores resultados foram para as nanocápsulas de quitosana contendo 1-decanol (1Dec-LbL₁) com atividade

inibitória de $74,6 \pm 1,9\%$ para a *Escherichia coli* e $73,6 \pm 1,5\%$ para a *Staphylococcus aureus*.

Embora não frequente, na literatura são reportadas atividades antimicrobianas de álcoois de cadeias médias e longas, como 1-decanol e o 1-dodecanol (ELGAALI *et al.*, 2002). Neste sentido, Golêbiowski e colaboradores (2012) desenvolveram um estudo utilizando diversos álcoois, entre os compostos utilizaram o 1-decanol, frente a vários micro-organismos. Os autores observaram que os álcoois com 6 (C6) a 10 (C10) carbonos em sua cadeia foram efetivos frente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fenômenos similares foram observados por Kubo e colaboradores (2003). Esses autores descreveram o alto potencial fungicida do 1-undecanol e 1-decanol ao testarem álcoois alifáticos primários de C6 a C13 contra o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo os autores, a ação antifúngica dos álcoois anfipáticos está relacionada com a capacidade dos compostos agirem como surfactantes não iônicos que atuam na membrana celular das leveduras rompendo-a, principalmente por perturbação da função de proteínas da membrana.

Mesmo o 1-decanol livre apresentando uma boa atividade inibitória frente aos micro-organismos, após o processo de nanoencapsulação, assim como para o linalol, essa inibição se tornou mais evidente. Possivelmente devido ao sinergismo entre os componentes das formulações, assim como o efeito do tamanho nano sobre os fungos e bactérias.

TABELA 28 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (Cl₅₀) PARA AS AMOSTRAS LINALOL, 1-DECANOL, NANOEMULSÃO (Ne) DE LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCs LbL₁ E LbL₂) E NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS (NCs LbL₁ E LbL₂ vazias) FRENTE AOS FUNGOS *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, E BACTÉRIAS *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

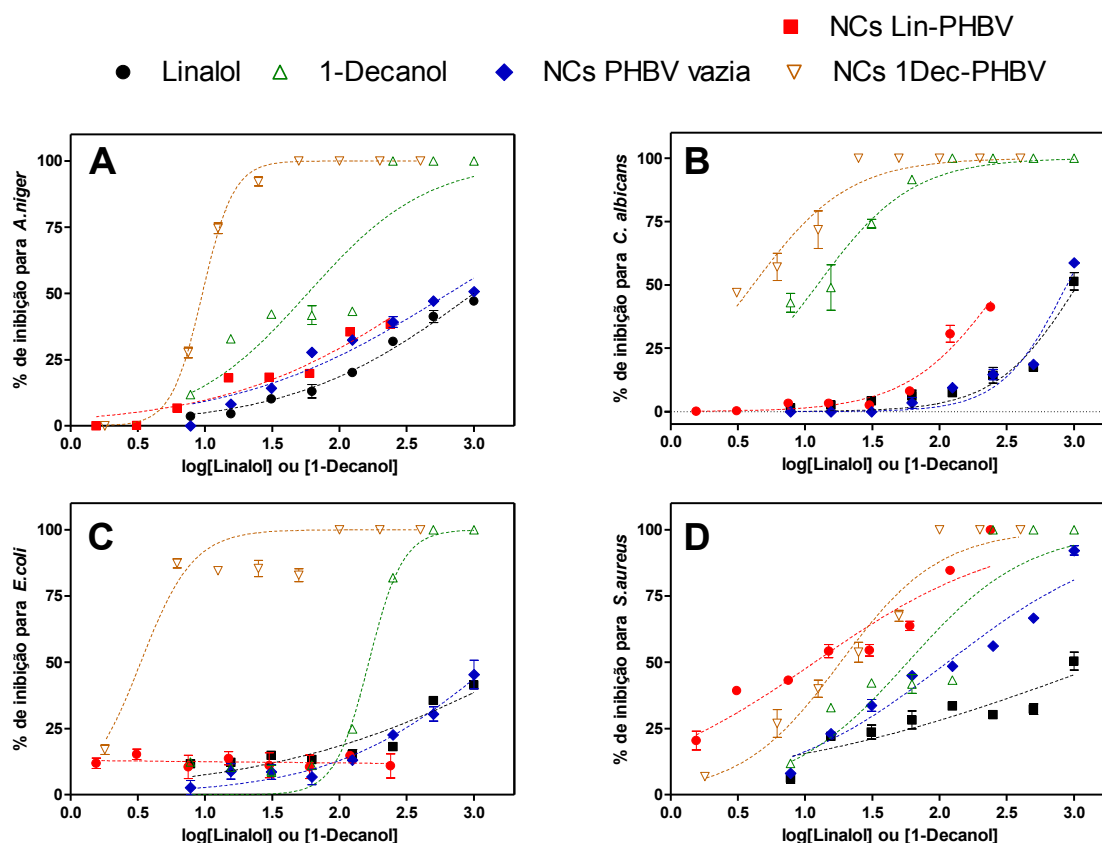
	Linalol	Ne	Lin-LbL ₁	Lin-LbL ₂	1-Decanol	Ne	1Dec-LbL ₁	1Dec-LbL ₂	LbL ₁ vazia	LbL ₂ vazia
<i>Aspergillus niger</i>										
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	28,9	13,9	21,1	24,5	21,4	4,9	4,5	77,8	250,0
Erro	1,08	1,05	1,08	1,17	1,04	1,02	1,07	1,05	1,07	1,06
R ²	0,977	0,983	0,968	0,921	0,986	0,993	0,959	0,976	0,976	0,979
<i>Candida albicans</i>										
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	45,3	9,9	116,4	12,3	27,8	5,9	5,7	147,1	147,0
Erro	1,09	1,11	1,02	1,07	1,10	1,04	1,15	1,13	1,32	1,35
R ²	0,972	0,946	0,995	0,950	0,937	0,982	0,872	0,916	0,994	0,898
<i>Escherichia coli</i>										
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	93,5	10,7	9,8	165,5	132,5	10,4	12,1	111,7	270,0
Erro	1,43	1,12	1,05	1,14	1,06	1,03	1,03	1,05	1,06	1,22
R ²	0,832	0,935	0,979	0,911	0,966	0,988	0,989	0,970	0,971	0,824
<i>Staphylococcus aureus</i>										
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	44,3	6,1	6,8	58,1	11,9	5,1	5,2	156,5	754,1
Erro	1,57	1,15	1,12	1,16	1,23	1,15	1,08	1,12	1,07	1,12
R ²	0,768	0,916	0,929	0,905	0,838	0,915	0,947	0,929	0,962	0,845

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Cl₅₀: Concentração inibitória de 50%, R²: coeficiente de determinação, Ne: nanoemulsão.

As atividades antifúngica e antibacteriana também foram avaliadas para as nanocápsulas obtidas com o polímero PHBV contendo o linalol, 1-decanol e o eugenol, assim como para as nanocápsulas na ausência desses ativos frente aos fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os valores foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento do micro-organismo por logaritmo da concentração dos compostos puros ou presentes nas nanocápsulas. Os valores de inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pelos compostos encapsulados linalol e 1-decanol podem ser observados na FIGURA 67, já para o eugenol podem ser observados na FIGURA 68. Em adição, os valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀), os respectivos erros e coeficiente de determinação (R²) encontram-se na TABELA 30.

FIGURA 67 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) PARA (A) *Aspergillus niger*, (B) *Candida albicans*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Staphylococcus aureus* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV Lin-PHBV OU 1Dec-PHBV, NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCs PHBV vazias)



FONTE: O autor (2021)

Como observados anteriormente, o linalol livre não apresentou uma boa atividade inibitória dos micro-organismos (CI_{50} : $> 998,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ao ser encapsulado em PHBV sua atividade foi melhorada, sendo mais eficiente para a *Staphylococcus aureus* com CI_{50} de $11,7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o 1-decanol livre, observou-se uma boa atividade inibitória para todos os micro-organismos com CI_{50} abaixo de $165,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após a encapsulação em PHBV, apresentou atividade inibitória para todos os micro-organismos, com baixos valores de CI_{50} ($< 18,3 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para o *Aspergillus niger* a CI_{50} foi de $9,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em relação a *Escherichia coli* e a *Candida albicans*, as nanocápsulas de PHBV contendo 1-decanol foram as mais eficientes com CI_{50} de $3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para a *Staphylococcus aureus* a CI_{50} foi de $18,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, maior que para os outros micro-organismos, entretanto, um valor excelente em comparação com o ativo livre.

Em relação as nanocápsulas na ausência dos ativos, as inibições dos micro-organismos foram inferiores às observadas para as nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose. O valor de CI_{50} mais baixo foi observado para *Staphylococcus aureus* ($114,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Essa inibição dos fungos e bactérias pode estar relacionada aos tamanhos das nanocápsulas, na ordem de 82 nm.

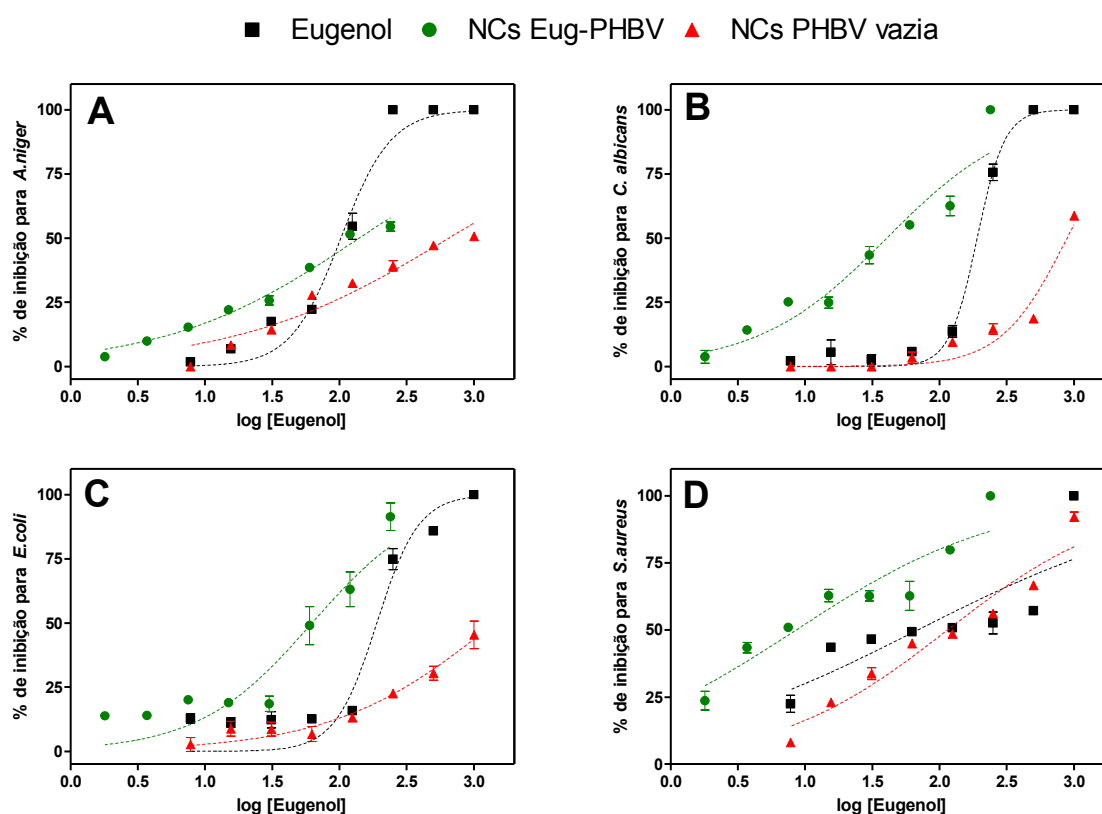
Na FIGURA 68 encontram-se os valores de inibição dos micro-organismos para o eugenol livre e sua formulação. Ao observar os valores de inibição do eugenol livre nota-se que há a atividade inibitória para todos os micro-organismos, sendo a mais eficiente para a *Staphylococcus aureus* com CI_{50} de $68,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da nanoencapsulação do eugenol observou-se uma melhora na inibição das bactérias e da levedura, com CI_{50} inferiores às obtidas para o composto livre. Sendo de $62,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Escherichia coli*, $8,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Staphylococcus aureus* e $40,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a *Candida albicans*. Apenas para o *Aspergillus niger* a encapsulação eugenol não se mostrou melhor que para o ativo livre.

Embora o 1-decanol encapsulado tenha sido o composto mais eficiente na inibição do crescimento dos micro-organismos testados, o eugenol encapsulado também demonstrou atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos testados. Outros estudos já haviam relatado a atividade antimicrobiana do eugenol. Marchese e colaboradores (2017) detalharam em uma revisão bibliográfica os dados científicos dos principais estudos publicados que descrevem as atividades antibacteriana e antifúngica do eugenol visando diferentes tipos de micro-organismos,

como os responsáveis por doenças infecciosas humanas, doenças da cavidade oral e patógenos de origem alimentar.

Nos testes, o linalol foi o composto livre com menor eficiência antimicrobiana corroborando com dados da literatura anteriormente mencionados. Quando encapsulado tornou-se mais eficiente para o controle da bactéria com estrutura Gram-positiva. Essa menor eficiência de inibição pode estar relacionada com a quiralidade desse composto, uma vez que já foi relatado em literatura que o (+)-linalol exerceu uma melhor atividade inibitória frente a bactéria *Aeromonas hydrophila* (SILVA *et al.*, 2017). No presente trabalho, como determinado experimentalmente, foi utilizada a mistura de (±)-linalol, contendo maior teor de (-)-linalol.

FIGURA 68 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) PARA (A) *Aspergillus niger*, (B) *Candida albicans*, (C) *Escherichia coli*, (D) *Staphylococcus aureus* EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS COM EUGENOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV Eug-PHBV E NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (NCs PHBV vazias)



FONTE: O autor (2021)

TABELA 29 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (Cl₅₀) PARA AS AMOSTRAS LINALOL, 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV DE LINALOL OU 1-DECANOL (NCs Lin-PHBV E 1Dec-PHBV) E NANOCÁPSULAS PHBV NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS (NCs PHBV vazias) FRENTE AOS FUNGOS *Aspergillus niger*, *Candida albicans* E BACTÉRIAS *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

	Linalol	NCs Lin-PHBV	NCs PHBV	1-Decanol	NCs 1Dec-PHBV	Eugenol	NCs Eug-PHBV
<i>Aspergillus niger</i>							
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	998,2	451,9	651,1	58,1	9,5	110,6	140,4
Erro	1,09	1,24	1,16	1,17	1,23	1,07	1,08
R ²	0,977	0,922	0,928	0,838	0,996	0,972	0,978
<i>Candida albicans</i>							
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	294,6	889,2	12,3	4,2	191,0	40,6
Erro	1,10	1,09	1,06	1,09	1,12	1,03	1,14
R ²	0,913	0,950	0,942	0,937	0,909	0,992	0,923
<i>Escherichia coli</i>							
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000,0	-	>1000	165,5	3,4	190,1	62,7
Erro	1,4	-	1,17	1,17	1,06	1,09	1,16
R ²	0,836	-	0,924	0,967	0,874	0,934	0,871
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Cl ₅₀ (µg mL ⁻¹)	>1000	11,7	114,8	58,07	18,3	68,9	8,5
Erro	1,57	1,18	1,13	1,23	1,10	1,37	1,21
R ²	0,768	0,893	0,935	0,838	0,959	0,681	0,868

FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Cl₅₀: Concentração inibitória de 50%, R²: coeficiente de determinação.

O 1-decanol apresentou excelentes atividades inibitórias tanto na forma livre, como nanoemulsionado ou nanoencapsulado, sendo um potencial agente antifúngico e antibacteriano. Do mesmo modo que o 1-decanol, o eugenol também foi responsável pela inibição eficiente dos micro-organismos, quando encapsulado, em geral, exibiu melhor atividade antimicrobiana, possivelmente pela liberação controlada que as nanocápsulas apresentam, ou ainda, pelo tamanho em escala nanométrica. Em relação às nanocápsulas na ausência dos ativos se mostrarem com boas atividades inibitórias, à medida que as amostras foram diluídas a atividade das nanocápsulas contendo os ativos ficou evidenciada, provavelmente por ação do ativo sobre os micro-organismos. Pelo fato das nanocápsulas vazias tanto de quitosana como de PHBV apresentarem atividade antimicrobiana na maioria dos testes realizados anteriormente, decidiu-se investigar os possíveis efeitos.

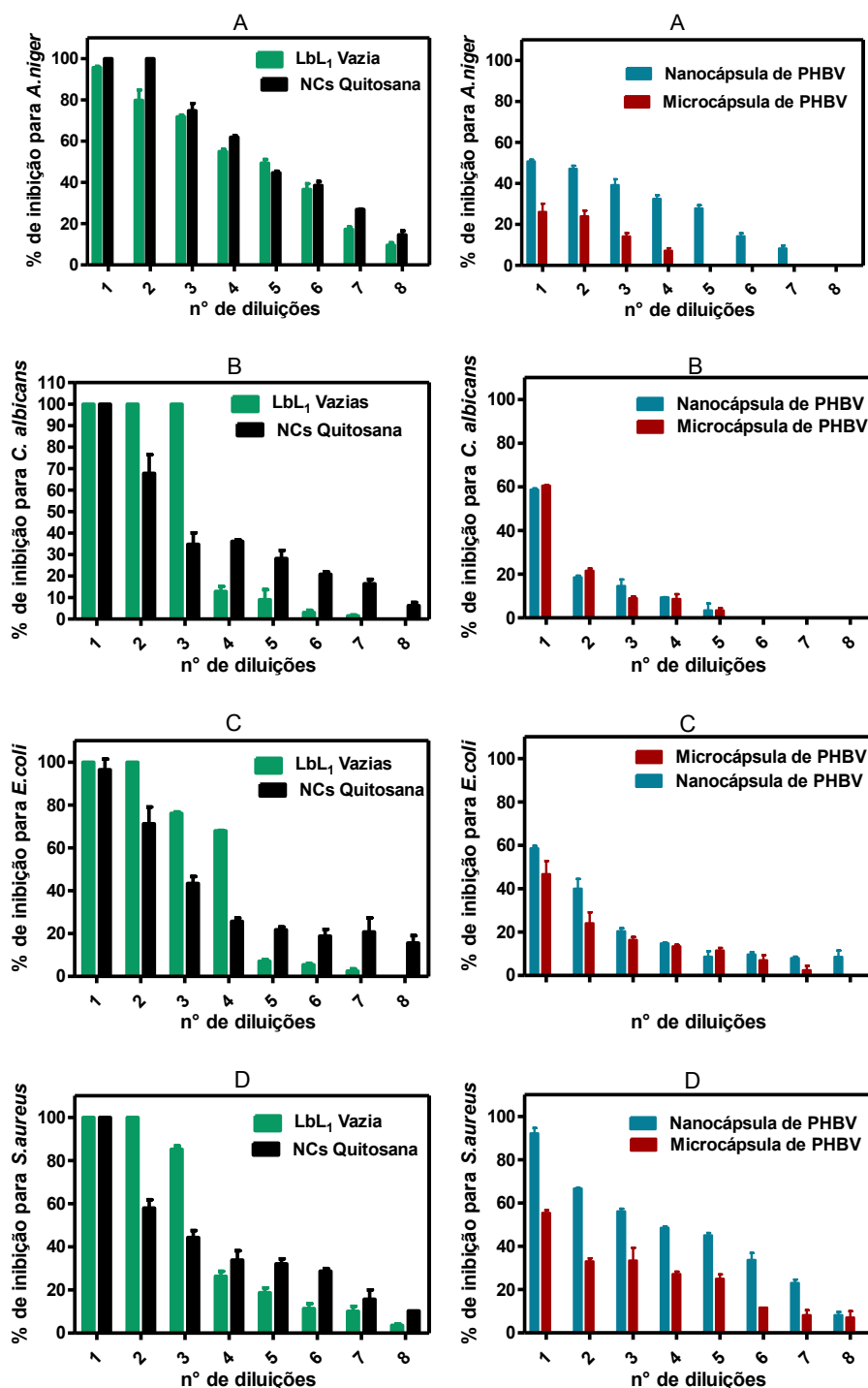
A fim de testar se a composição das nanocápsulas aliada à superfície de contato seriam as responsáveis por essas atividades antimicrobianas acentuadas, foram preparadas nanocápsulas de quitosana com tripolifosfato de sódio por meio da técnica de gelificação ionotrópica e microcápsulas de PHBV pela técnica emulsão por evaporação do solvente. As nano e microcápsulas foram caracterizadas por DLS e potencial ζ . Para as nanocápsulas de quitosana foi obtido D_{happ} de 212 ± 18 nm e potencial de superfície de $9,5 \pm 1,8$ mV, já para as microcápsulas de PHBV o D_{happ} foi de 1044 ± 28 nm e potencial ζ de $-6,0 \pm 2,0$ mV.

As nano e microcápsulas foram testadas frente aos fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e os valores de inibição podem ser observados na FIGURA 69. Os dados foram expressos em porcentagem de inibição do micro-organismo por número de diluições das amostras.

Para as nanocápsulas de quitosana observa-se um comportamento parecido com as nanocápsulas vazias (LbL₁ Vazias) indicando que os efeitos observados anteriormente podem estar relacionados com a composição das nanocápsulas, formadas com o polímero quitosana. A quitosana é um polímero conhecido quanto a sua atividade antimicrobiana. Goy e colaboradores (2016) descreveram o mecanismo de ação pelo qual essa atividade pode ser expressa. A presença de grupos amino carregados na estrutura do polímero promovem interações iônicas com os constituintes da parede celular dos micro-organismos, consequentemente isso

ocasiona a hidrólise dos peptidoglicanos na parede do micro-organismo e provocando o vazamento de eletrólitos intracelulares, levando o micro-organismo à morte. Além disso, a quitosana ionizada também pode interagir com nutrientes essenciais, interferindo no crescimento microbiano.

FIGURA 69 - VALORES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%) DOS FUNGOS (A) *Aspergillus niger* (B) *Candida albicans* E DAS BACTÉRIAS (C) *Escherichia coli* (D) *Staphylococcus aureus* UTILIZANDO AS NANOCÁPSULAS VAZIAS DE QUITOSANA, MICRO E NANOCÁPSULAS VAZIAS DE PHBV



FONTE: O autor (2021)

Outro fator que pode estar contribuindo para a melhor atividade antimicrobiana é o tamanho em nanoescala dos sistemas. Ing e colaboradores (2012) já haviam observado que nanopartículas de quitosana com menores tamanhos apresentavam melhor inibição de micro-organismos, possivelmente devido à difusão das nanopartículas nas células fúngicas. Neste mesmo estudo, os autores observaram que nanopartículas obtidas a partir de quitosana com tamanhos próximos a 300 nm também exerceram fortes atividades antimicrobianas, devido às altas cargas de superfície que elas apresentavam (54-50 mV), promovendo interações com a superfície celular microbiana ionizadas negativamente.

Já para as nanocápsulas de PHBV o efeito que pode estar predominando é o da superfície de contato devido ao tamanho das nanocápsulas. Com exceção da *Candida albicans*, é possível observar que as microcápsulas demonstram menor efeito antimicrobiano em relação às nanocápsulas. Possivelmente, materiais em escala nanométrica apresentam maior facilidade em causar danos nos micro-organismos ou mesmo se difundirem pelas paredes celulares microbianas.

Dessa forma, foi possível comprovar que tanto a composição como o tamanho reduzido exercem influência sobre esses micro-organismos testados. Esses resultados são importantes, pois as nanocápsulas podem também ser utilizadas na ausência dos ativos e da mesma forma promover um controle microbiano efetivo.

Após os ensaios antimicrobianos e para observar possíveis interações entre os micro-organismos e as formulações desenvolvidas, foram realizadas análises de potencial ζ . As formulações foram misturadas com os micro-organismos na mesma proporção que para os ensaios antimicrobianos (1:1 v v⁻¹), após 30 min cada amostra foi avaliada por 100 s no potencial ζ .

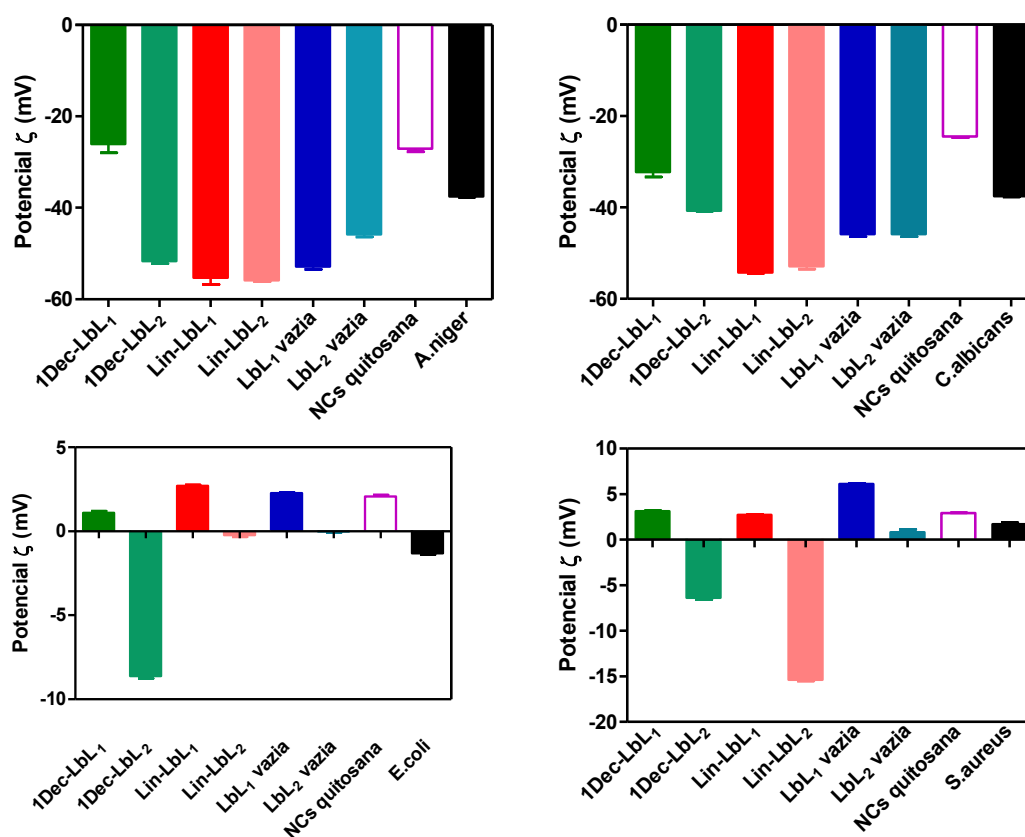
Na FIGURA 70 encontram-se os valores de potencial ζ referentes às formulações obtidas com quitosana e carboximetilcelulose contendo linalol ou 1-decanol, além das nanocápsulas vazias e os micro-organismos. Para os fungos observa-se um comportamento similar das amostras, sendo as nanocápsulas de 1Dec-LbL₁ e nanocápsulas de quitosana, as amostras que mais se aproximaram dos valores de potencial ζ dos fungos (próximo a -40 mV), possivelmente devido às cargas positivas da quitosana interagirem ionicamente com as camadas de fosfolipídios das células dos fungos. No caso das nanocápsulas contendo 1-decanol, esse efeito pode ter sido potencializado pelo composto. As demais nanocápsulas também podem estar

interagindo, como observado anteriormente por meio dos ensaios antimicrobianos, mas em menor intensidade.

As bactérias *Escherichia coli* e a *Staphylococcus aureus* apresentaram valores de potencial ζ próximos a 0 mV, as nanocápsulas 1Dec-LbL₂ e Lin-LbL₂ mostraram comportamento diferente, possivelmente devido a apresentarem potenciais de superfície negativos devido à camada externa de carboximetilcelulose, interferindo na interação com esses micro-organismos.

Possivelmente essas nanocápsulas, devido às interações com os fungos ou bactérias, se acumulam nas suas superfícies e podem causar danos às membranas celulares, ou liberar os compostos ativos que adentram essas membranas e perturbam o fluxo natural de seu funcionamento, ambas as perturbações podem levar à morte dos micro-organismos (DIVYA; JISHA, 2018).

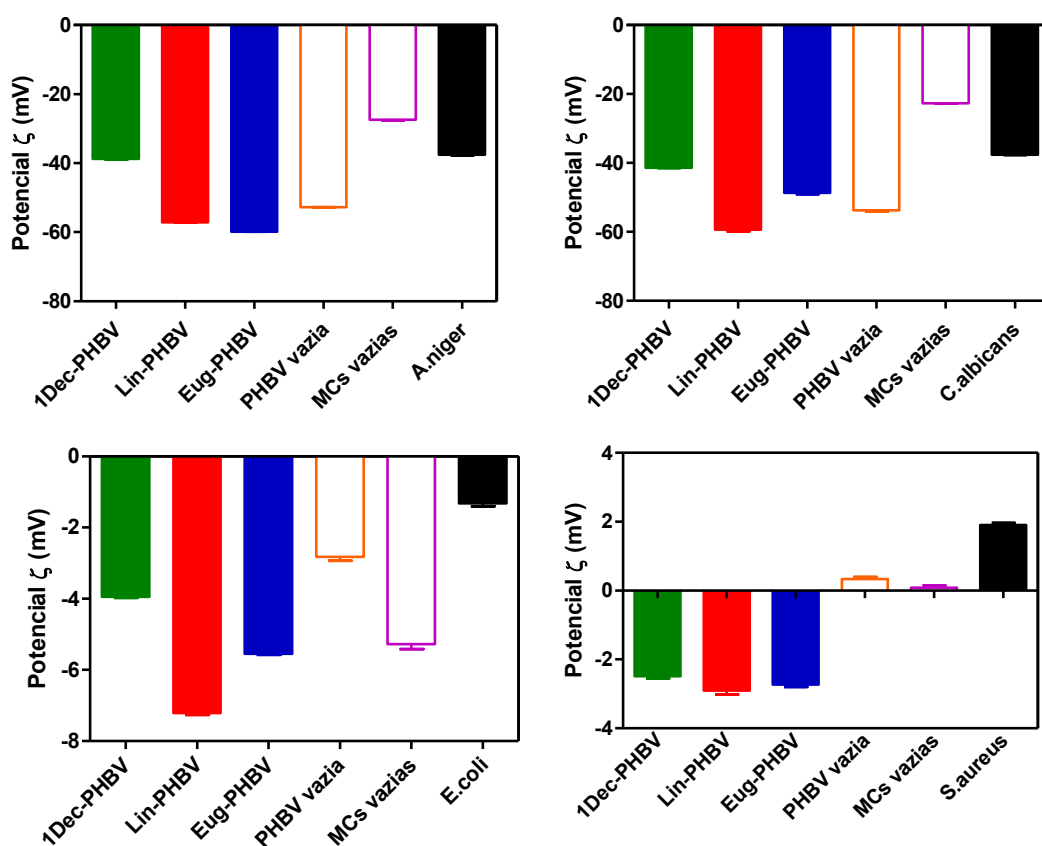
FIGURA 70 – VALORES DE POTENCIAL ζ PARA A MISTURA DAS FORMULAÇÕES DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE COM OS MICRO-ORGANISMOS



FONTE: O autor (2021)

Os dados para as formulações obtidas a partir do polímero PHBV contendo linalol, 1-decanol ou eugenol, além das micro e nanocápsulas vazias podem ser visualizados na FIGURA 71. Resultados semelhantes para os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* foram obtidos. Todas as amostras apresentaram potencial ζ negativo, aparentemente as nanocápsulas de 1Dec-PHBV podem apresentar melhor interação com ambos os fungos, corroborando com os ensaios antimicrobianos. Ao observar os valores de potencial ζ para a análise envolvendo a *Escherichia coli*, percebe-se que as nanocápsulas 1Dec-PHBV e as nanocápsulas PHBV vazias apresentam comportamento mais próximo ao da bactéria. Em relação a *Staphylococcus aureus*, tanto as nanocápsulas com as microcápsulas são as amostras que mais se aproximam do valor do potencial ζ para o micro-organismo corroborando com os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos para as cápsulas vazias.

FIGURA 71 - VALORES DE POTENCIAL ζ PARA A MISTURA DAS FORMULAÇÕES DE PHBV COM OS MICRO-ORGANISMOS



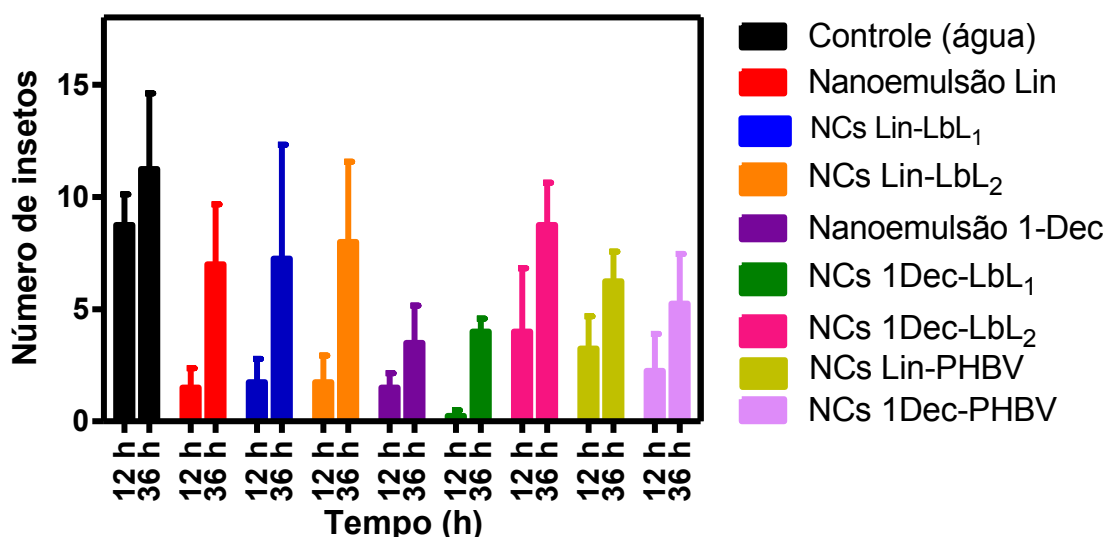
FONTE: O autor (2021)

Nesta direção, por meio dessa análise observa-se que os valores de potencial ζ mudaram e essa mudança pode estar associada aos danos nas estruturas das células. Em adição, a membrana celular tanto dos fungos como das bactérias podem ser o alvo principal ou podem permitir o acúmulo das nanocápsulas, aumentando assim a concentração local de ativo que pode levar à inibição dos micro-organismos, ou ainda, devido ao tamanho em escala nanométrica, esses nanomateriais adentram as membranas celulares dos patógenos levando-os à morte.

4.6.4. Ensaios de repelência da *Bemisia tabaci*

E por fim, foram realizados os ensaios de repelência em relação à mosca branca utilizando as Formulações 3 e 4 (nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose) e Formulações 6 e 7 (nanocápsulas de PHBV) contendo linalol e 1-decanol, respectivamente. Os resultados de repelência das amostras em relação aos insetos encontram-se na FIGURA 72.

FIGURA 72 - ENSAIOS DE REPELÊNCIA DA *Bemisia tabaci* EM RELAÇÃO ÀS NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA, CARBOXIMETILCELULOSE E PHBV CONTENDO LINALOL OU 1-DECANOL



FONTE: O autor (2021)

É possível observar que após 12 h de tratamento, a maioria das amostras promoveram repelência à *B. tabaci*, exceto o controle negativo. As plantas que apresentaram menor presença da mosca branca são as que foram tratadas com as formulações contendo 1-decanol em sua composição, sendo elas: a nanoemulsão de

1-decanol e as nanocápsulas de quitosana contendo 1-decanol (NCs 1Dec-LbL₁). Entretanto, após 36 h de teste ocorre o aumento no número de insetos nas plantas de tomate para todos os tratamentos ($p > 0,05$). Como as amostras são aspergidas sobre as plantas, pode ser que ocorra o rompimento das nanocápsulas ocasionando a liberação mais rápida dos ativos, diminuindo o efeito de repelência ao longo do tempo.

Embora os resultados não tenham sido atrativos, eles corroboram com os dados observados por Togni e colaboradores (2010) e Carvalho e colaboradores (2017), em que a planta coentro exerce uma atividade de repelência à mosca branca ou mascaramento dos voláteis da planta hospedeira frente ao inseto. Esses fenômenos possivelmente estão relacionados com os voláteis presentes em maior quantidade nas folhas do coentro, pois foi observado que as nanocápsulas de linalol não apresentaram uma boa repelência.

A baixa repelência do linalol pode estar relacionada com a quiralidade da molécula. Na literatura foi reportado que tanto o (-)-linalol quanto o (±)-linalol ativam os receptores odoríferos do inseto *Anopheles gambiae*, entretanto, o (±)-linalol apresentou uma resposta muito mais pronunciada de ativação do que o (-)-linalol (HUFF; PITTS, 2019). Como no presente trabalho foi utilizada a mistura (±)-linalol, a baixa repelência pode estar associada com os enantiômeros, e ao invés de repelir está atraindo os insetos como observado por Sacchetti e colaboradores (2015), que mostraram que o linalol exerceu atividade atratora da mosca branca.

Outro fator que pode ter levado a resultados insatisfatórios é que os ensaios realizados por Togni e colaboradores (2010) e Carvalho e colaboradores (2017) foram utilizando a planta coentro inteira, ou seja, o efeito pode ter sido observado devido ao sinergismo entre os voláteis presentes no coentro. Esses resultados nos mostram a importância de estudos posteriores para aprimorar as formulações, utilizando uma mistura de compostos ou mesmo o óleo essencial, e, dessa forma, tentar manter a repelência da *B. tabaci* por tempos mais longos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho forneceu informações relevantes para o desenvolvimento de novas metodologias utilizando nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose e nanocápsulas de PHBV incorporadas com eugenol, linalol ou 1-decanol.

Inicialmente, o óleo essencial das sementes do *C. sativum* foi extraído por hidrodestilação e identificado 14 constituintes, sendo o linalol seu composto majoritário. Para as folhas do *C. sativum* foram realizados dois preparos de amostras, sendo o primeiro utilizando nitrogênio líquido e o segundo apenas maceração à temperatura ambiente. A forma de preparo das amostras resultou na identificação de diferentes compostos, para o primeiro preparo foram identificados 27 constituintes, sendo o composto majoritário o (2E)-dodecenal e para o segundo preparo de amostra foram identificados 36 compostos, sendo o 1-decanol o composto majoritário. Após a identificação dos compostos, foram realizadas as obtenções das nanocápsulas.

Os polímeros foram devidamente caracterizados quanto às suas características físico-químicas e estruturais. As nanoemulsões obtidas com os ativos e com lauril sulfato de sódio serviram como *templates* para posterior autoassociação LbL dos polissacarídeos. Nesta etapa de formação das nanocápsulas para a segunda formulação, foi realizada a otimização da nanoemulsão para manter as gotículas mais uniformes, sendo o tempo ideal de 10 minutos de sonicação. Observou-se que a ordem de adição dos precursores na primeira etapa interfere no tamanho das nanocápsulas. Dessa forma, para as formulações subsequentes foi adotada a adição da nanoemulsão sobre a dispersão polimérica de quitosana.

Com a técnica de potencial ζ foi possível confirmar a inversão do potencial de superfície no plano de cisalhamento das nanocápsulas a cada camada polimérica de quitosana ou carboximetilcelulose depositada sobre a nanoemulsão. Os diâmetros hidrodinâmicos aparentes foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico e a forma esférica das cápsulas para a primeira formulação desenvolvida foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Tanto o potencial ζ como espalhamento de luz dinâmico foram utilizados para caracterizar as nanocápsulas obtidas a partir do PHBV.

Para o cálculo da eficiência de incorporação e o teste de liberação do eugenol a partir das nanocápsulas foi utilizada a técnica de espectrofotometria na região do UV-Vis. Por outro lado, para o linalol e 1-decanol foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE-UV-Vis e CLAE-IR, respectivamente.

Para todas as nanocápsulas de quitosana e carboximetilcelulose foi observada que a incorporação dos ativos nas nanocápsulas diminuiu com o processo de centrifugação, pois há a perda da substância devido à velocidade intensa aplicada para a separação das nanocápsulas do que não reagiu. Já para as nanocápsulas obtidas com PHBV observou-se a maior eficiência de incorporação para o 1-decanol, composto menos solúvel em água, supostamente com maior afinidade com o polímero PHBV.

O revestimento das nanoemulsões com sucessivas camadas de polissacarídeos modificou a liberação dos ativos. Em geral, houve uma liberação rápida na primeira hora seguida de uma liberação gradual, enquanto as nanoemulsões liberaram os ativos mais rapidamente por aumentar sua solubilidade. Por meio do modelo de primeira ordem e cálculo da constante de liberação foi confirmado que à medida que foi aumentado o número de camadas de polímero diminuiu a constante de liberação. Esses dados podem ser relacionados com os testes realizados para os micro-organismos, a encapsulação melhorou a atividade dos ativos. Entretanto, com uma liberação mais lenta nas nanocápsulas com crescentes camadas poliméricas a eficiência frente aos micro-organismos foi diminuída.

Entre os compostos, o eugenol foi o responsável por apresentar uma melhor atividade antioxidante em relação aos radicais livres do DPPH e ABTS. Quando encapsulado tanto em quitosana e carboximetilcelulose quanto em PHBV, essa atividade foi diminuída, possivelmente devido à barreira que os polímeros exercem entre o ativo e o meio externo.

As medidas de ângulo de contato mostram parâmetros importantes como, por exemplo, energia livre de superfície e trabalho de adesão. Observou-se que esses parâmetros são alterados conforme a deposição das nanocápsulas com diferentes camadas poliméricas, isso prova que houve o revestimento com os materiais poliméricos, além de mostrar que as nanocápsulas com quitosana possuem melhor afinidade com a nectarina.

Para a Formulação 1, os ensaios biológicos mostraram que as amostras atuaram como inibidores do crescimento dos patógenos *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp e *Candida albicans*. A concentração inibitória mínima para o eugenol encapsulado foi menor do que a observada para o agente livre. A melhora da atividade pode ser atribuída à proteção do eugenol promovida pelas cápsulas (até três camadas poliméricas), em conjunto com um possível efeito sinérgico dos precursores (surfactante e polissacarídeo).

A Formulação 2 exibiu potencial para controlar a instalação e proliferação da podridão parda em nectarinas causada pelo fungo *Monilinia fructicola*. A melhor resposta foi obtida para as nanocápsulas Eug-LbL₁, além disso as nanocápsulas na ausência do eugenol também exerceram atividade interessante de controle do micro-organismo.

Para as Formulações 3, 4, 5, 6 e 7, os ensaios microbiológicos utilizando os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mostraram que ao encapsular os ativos o efeito de inibição tornou-se mais pronunciado do que quando o ativo livre. As formulações contendo linalol foram as que exerceram menor efeito de inibição dos micro-organismos. O eugenol mostrou inibição quando livre, e quando encapsulado, em geral, seu efeito inibitório foi potencializado frente aos patógenos. Em contrapartida, o 1-decanol promoveu uma excelente inibição quando livre, que foi potencializada quando encapsulado frente aos quatro micro-organismos testados. As nanocápsulas na ausência dos ativos também desempenharam atividade de inibição em relação aos micro-organismos, possivelmente devido à composição (quitosana) e à maior área de contato que materiais em escala nanométrica podem oferecer.

Os ensaios biológicos frente à mosca branca mostraram que a nanoemulsão e as nanocápsulas na presença do 1-decanol foram mais eficientes em relação à repelência desses insetos nas primeiras 12 horas. Entretanto, essas formulações necessitam ser aprimoradas, uma vez que o tempo de repelência foi baixo.

Diante do exposto, tanto as nanocápsulas produzidas com quitosana e carboximetilcelulose quanto as nanocápsulas obtidas a partir do PHBV utilizando substâncias naturais muito menos tóxicas do que pesticidas, representam a possibilidade de novos sistemas capazes de aprisionar compostos ativos, como eugenol, linalol e 1-decanol, tornando-se uma nova estratégia para reduzir a incidência de organismos patogênicos, como por exemplo, o *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, *Candida albicans*, *Monilinia fructicola*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Bemisia tabaci*.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Impact of some environmental factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 10–16, 2019.
- ABBAS, S.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81–92, 2015.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy**. 2005.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; YOUSUF, S.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1157–1162, 2010.
- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.
- ALI, A.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; et al. Insecticidal and biting deterrent activities of magnolia grandiflora essential oils and selected pure compounds against aedes aegypti. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020.
- ALIZADEH, M.; VASEBI, Y.; SAFAIE, N. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. **Open Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 404–440, 2020.
- APROTOSOAIE, A. C.; HÂNCIANU, M.; COSTACHE, I. I.; MIRON, A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193–219, 2014.
- ASBAHANI, A. E.; MILADI, K.; BADRI, W.; et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.
- ASBAHANI, A. EL; MILADI, K.; BADRI, W.; et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARRO, P. J. DE; LIU, S.; BOYKIN, L. M.; DINSDALE, A. B. Bemisia tabaci : A Statement of Species Status. , 2011.
- BATIHA, G. E. S.; ALKAZMI, L. M.; WASEF, L. G.; et al. Syzygium aromaticum L. (myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.
- BEATRIZ, C.; CAMBAZA, E. **Biologia dos Fungos**. 2015.
- BENELLI, GIOVANNI; FLAMINI, G.; FIORE, G.; CIONI, P. L.; CONTI, B. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of Coriandrum sativum L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1155–1161, 2013.
- BENELLI, G.; FLAMINI, G.; FIORE, G.; CIONI, P. L.; CONTI, B. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of Coriandrum sativum L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1155–1161, 2013.
- BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; et al. Essential oils loaded in nanosystems: A developing

- strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. e651593, 2014.
- BOLFE, É. L.; CAMPOS, S. K.; JÚNIOR, M. A. G. P.; et al. Futuro da Agricultura Brasileira. **Embrapa**, p. 212, 2018.
- BONDI, C. A. M.; MARKS, J. L.; WROBLEWSKI, L. B.; et al. Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. **Environmental Health Insights**, v. 9, p. 1765, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011. Disponível em: <<http://www.dema.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/viewFile/222/204>>. .
- BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, p. 9921–9927, 2001.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, n. 2, p. 367–375, 2007.
- BURSZTYN, M. A.; BURSZTYN, M. **FUNDAMENTOS DE POLÍTICA E GESTÃO AMBIENTAL, Caminhos para a sustentabilidade**. 2013.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- CAMPOS, E. V. R.; PROENÇA, P. L. F.; OLIVEIRA, J. L.; et al. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. **Ecological Indicators**, , n. April, p. 0–1, 2018. Elsevier.
- CARVALHO, MATEUS GIMENEZ; BORTOLOTO, O. C.; VENTURA, M. U. Aromatic plants affect the selection of host tomato plants by Bemisia tabaci biotype B. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 162, n. 1, p. 86–92, 2017.
- CARVALHO, M. G.; BORTOLOTO, O. C.; VENTURA, U. Aromatic plants affect the selection of host tomato plants by Bemisia tabaci biotype B. , p. 86–92, 2017.
- CHAI, FUJUAN; SUN, L.; HE, X.; et al. Doxorubicin-loaded poly (Lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1791–1802, 2017.
- CHAI, F.; SUN, L.; HE, X.; et al. Doxorubicin-loaded poly (Lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1791–1802, 2017.
- CHALUPSKY, J. BOOK REVIEW: Kinkela D.: DDT & THE AMERICAN CENTURY. Global Health, Environmental Politics, and the Pesticide That changed the World. **European Journal of Entomology**, v. 109, n. 3, p. 462–462, 2012.
- CHEN, C.; YU, Y.; WANG, X.; et al. Manipulation of pH-Sensitive interactions between podophyllotoxin-chitosan for enhanced controlled drug release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, n. January, p. 451–461, 2017.

- CHEN, R. H.; TSAIH, M. L. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 135–141, 1998.
- CHI, K.; CATCHMARK, J. M. Improved eco-friendly barrier materials based on crystalline nanocellulose/chitosan/carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 195–205, 2018.
- CHIAPPISI, L.; GRADZIELSKI, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 220, p. 92–107, 2015.
- CHUNG, I. M.; AHMAD, A.; KIM, S. J.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P. Composition of the essential oil constituents from leaves and stems of Korean *Coriandrum sativum* and their immunotoxicity activity on the *Aedes aegypti* L. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 1, p. 152–156, 2012.
- CLEAVER JR, H. M. The Contradictions of the Green Revolution. **The American Economic Review**, v. 62, n. 1, p. 177- 186, 1972.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE M27. CLSI, 2017. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. , v. 4th ed., p. Wayne, Pennsylvania, 19087 USA., 2017.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE M38. CLSI, 2017. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. , v. 4th ed., p. Wayne, Pennsylvania, 19087 USA., 2017.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014.
- COSGROVE, T. **Colloid Science Principles, Methods and Applications Colloid**. .
- DAS, S.; SINGH, V. K.; DWIVEDY, A. K.; et al. Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 294–305, 2019.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, p. 981–1014, 2011a.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011b.
- DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. August, p. 1232- 1237 ST- Fuzzy Nanoassemblies: toward layer, 1997.
- DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v. 95, p. 1430–1434, 1991.
- DECHER, G.; SCHMITT, J. Fine-Tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. **Trends in Colloid and Interface Science VI**, v. 164, p. 160–164, 1992.
- DENG, C.; SONG, G.; HU, Y.; ZHANG, X. Determination of the volatile constituents of Chinese

- Coriandrum Sativum L. by gas chromatography - Mass spectrometry with solid-phase microextraction. **Chromatographia**, v. 57, n. 5–6, p. 357–361, 2003.
- DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M. R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 2020.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan : antimicrobial activity , interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703–714, 2004.
- DHOOT, G.; AURAS, R.; RUBINO, M.; DOLAN, K.; SOTO-VALDEZ, H. Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR-ATR flow cell and HPLC techniques. **Polymer**, v. 50, n. 6, p. 1470–1482, 2009.
- DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.
- DIVYA, K.; JISHA, M. S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 101–112, 2018.
- DOBRYNIN, A. V.; COLBY, R. H.; RUBINSTEIN, M. Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions. **Macromolecules**, v. 28, p. 1859–1871, 1995.
- DOMINGUEZ, ANA; FERNANDEZ, A.; GONZALEZ, N.; IGLESIAS, E.; MONTENEGRO, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 10, p. 1227, 1997.
- DOMINGUEZ, A.; FERNANDEZ, A.; GONZALEZ, N.; IGLESIAS, E.; MONTENEGRO, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. **Journal of Chemical Education**, v. 74, p. 1227, 1997.
- DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106–120, 2016.
- DOROSHENKO, I.; POGORELOV, V.; SABLINSKAS, V. Infrared Absorption Spectra of Monohydric Alcohols. **Dataset Papers in Chemistry**, v. 2013, n. October 2012, p. 1–6, 2013.
- DOSHI, B.; REPO, E.; HEISKANEN, J. P.; SIRVIÖ, J. A.; SILLANPÄÄ, M. Effectiveness of N,O-carboxymethyl chitosan on destabilization of Marine Diesel, Diesel and Marine-2T oil for oil spill treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 326–336, 2017.
- DOWLING, M. E.; BRIDGES, W. C.; COX, B. M.; et al. Preservation of Monilinia fructicola genotype diversity within fungal cankers. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 526–530, 2019.
- DUAN, B.; DONG, C.; YUAN, X.; YAO, K. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15, p. 797–811, 2004.
- DUARTE, A.; LUÍS, Â.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F. C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control Campylobacter spp. **Food Control**, v. 61, p. 115–122, 2016.
- ELGAALI, H.; HAMILTON-KEMP, T. R.; NEWMAN, M. C.; et al. Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 373–380, 2002.

- ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1819–1841, 2013.
- EOM, M. R.; WEON, J. B.; JUNG, Y. S.; et al. Neuroprotective compounds from *Reynoutria sachalinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 40, n. 6, p. 704–712, 2017.
- EYLER, R. W.; KLUG, E. D.; DIEPHUIS, F. Determination of Degree of Substitution of Sodium Carboxymethylcellulose. **Analytical Chemistry**, v. 19, p. 24–27, 1947.
- EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.
- EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, 2013.
- FERNANDEZ-MEGIA, E.; NOVOA-CARBALLAL, R.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ¹H-NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 2, p. 155–161, 2005.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. DE. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111–124, 2004.
- FUGUET, E.; RÀFOLS, C.; ROSÉS, M.; BOSCH, E. Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, p. 95–100, 2005.
- FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; et al. NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. **Organometallics**, v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 2010.
- GAO, Z.; VAN NOSTRAND, J. D.; ZHOU, J.; et al. Anti-listeria Activities of Linalool and Its Mechanism Revealed by Comparative Transcriptome Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, 2019.
- GAUTAM, A. K.; SHARMA, S.; AVASTHI, S.; BHADAURIA, R. Diversity, Pathogenicity and Toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 270–280, 2011.
- GOŁĘBIOWSKI, M.; DAWGUL, M.; KAMYSZ, W.; et al. Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 19, p. 3419–3428, 2012.
- GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 122–127, 2016.
- GUERRA, F. L.; LOPES, W.; CAZAROLLI, J. C.; et al. Biodeterioration of mortar coating in historical buildings: Microclimatic characterization, material, and fungal community. **Building and Environment**, v. 155, p. 195–209, 2019.
- GUO, F.; LIANG, Q.; ZHANG, M.; et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Linalool against

- Shewanella putrefaciens. **Microbial Pathogenesis**, v. 141, p. 1–17, 2020.
- GUZMÁN, E.; MATEOS-MAROTO, A.; RUANO, M.; ORTEGA, F.; RUBIO, R. G. Layer-by-Layer polyelectrolyte assemblies for encapsulation and release of active compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, n. April, p. 290–307, 2017.
- HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch - A review. **Macromolecular Symposia**, v. 223, p. 13–39, 2005.
- HO, F. F. L.; KLOSIEWICZ, D. W. Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry for Determination of Substituents and Their Distribution in Carboxymethylcellulose. **Analytical chemistry**, v. 52, p. 913–916, 1980.
- HOGG, S. **Essential Microbiology**. 2015.
- HOOGENDAM, C. W.; DE KEIZER, A.; COHEN S. M. A.; et al. Persistence Length of Carboxymethyl Cellulose As Evaluated from Size Exclusion Chromatography and Potentiometric Titrations. **Macromolecules**, v. 31, p. 6297–6309, 1998.
- HÖÖK, F.; KASEMO, B.; NYLANDER, T.; et al. Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 24, p. 5796–5804, 2001.
- HU, D.; WANG, H.; WANG, L. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 398–405, 2016.
- HU, J.; ZHANG, Y.; XIAO, Z.; WANG, X. Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 85–92, 2018.
- HUANG, Z.; PARIKH, S.; FISH, W. P. Interactions between a poorly soluble cationic drug and sodium dodecyl sulfate in dissolution medium and their impact on in vitro dissolution behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, p. 350–359, 2018.
- HUFF, R. M.; JASON PITTS, R. An odorant receptor from Anopheles gambiae that demonstrates enantioselectivity to the plant volatile, linalool. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–15, 2019.
- ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
- IDREES, H.; ZAIDI, S. Z. J.; SABIR, A.; et al. A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 1–22, 2020.
- ILER, K. R. Multilayers of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, p. 569–594, 1966.
- ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, p. 1–9, 2012a.
- ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012b.
- KAFLE, L.; SHIH, C. J. Toxicity and repellency of compounds from clove (*Syzygium aromaticum*) to red imported fire ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of economic entomology**,

v. 106, p. 131–5, 2013.

KAMINSKI, G. A. T.; SIERAKOWSKI, M. R.; PONTAROLO, R.; FREITAS, R. A. DE. Comparison between the interactions of the cationic surfactant DODAB with xanthan and galactomannan.

Carbohydrate Polymers, v. 115, p. 478–484, 2015.

KAMINSKI, G. A. T.; SIERAKOWSKI, M. R.; PONTAROLO, R.; SANTOS, L. A. DOS; FREITAS, R. A. DE. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor.

Carbohydrate Polymers, v. 140, n. August 2016, p. 129–135, 2016.

KASSEM, N. F.; NEGM, A. S.; SHUKRY, N.; EL-KALYOUSBY, S. Synthesis of pH-Sensitive CMC /Chitosan Hydrogels by Gamma Irradiation. **Journal of Composites and Biodegradable Polymers**, v. 2, p. 22–30, 2014.

KHUSH, G. S. Green revolution: the way forward. **NATURE REVIEWS | GENETICS**, v. 2, n. October, 2001.

KIM, K. W.; THOMAS, R. L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 308–313, 2007.

KOHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759–765, 2013.

KONO, H. ¹H and ¹³C chemical shift assignment of the monomers that comprise carboxymethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 384–390, 2013.

KONO, H.; OSHIMA, K.; HASHIMOTO, H.; SHIMIZU, Y.; TAJIMA, K. NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose: Substituent distribution and mole fraction of monomers in the polymer chains. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 1–9, 2016.

KUBO, I.; FUJITA, K. I.; KUBO, A.; NIHEI, K. I.; OGURA, T. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3329–3332, 2004.

KUBO, I.; FUJITA, K. ICHI; KUBO, A.; NIHEI, K. ICHI; LUNDE, C. S. Modes of antifungal action of (2E)-alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 3951–3957, 2003.

KUMAR, N.; PATHERA, A. K.; SAINI, P.; KUMAR, M. Harmful effects of pesticides on human health. , 2012.

LARIBI, B.; KOUKI, K.; M'HAMDI, M.; BETTAIEB, T. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. **Fitoterapia**, v. 103, n. January, p. 9–26, 2015.

LASRAM, S.; ZEMNI, H.; HAMDI, Z.; et al. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v. 134, n. March, p. 11–18, 2019.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQLI, A. N.; et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1149–1158, 2003.

LEE, Y. S. **Self-Assembly and Nanotechnology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

LI, W.; CHEN, H.; HE, Z.; et al. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 39–

47, 2015.

LI, Z.; WANG, Y.; PEI, Y.; et al. Effect of substitution degree on carboxymethylcellulose interaction with lysozyme. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 222–229, 2017.

LIU, Y.; YANG, J.; ZHAO, Z.; et al. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, n. 1, p. 130–140, 2012.

MAHBOUB, R.; MEMMOU, F. Antioxidant activity and kinetics studies of eugenol and 6-bromoeugenol. **Natural Product Research**, v. 29, n. 10, p. 966–971, 2015.

MAHMOOD, I.; IMADI, S. R.; SHAZADI, K.; GUL, A.; HAKEEM, K. R. **Effects of Pesticides on Environment**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

MAIA, L. C.; DE CARVALHO JÚNIOR, A. A.; CAVALCANTI, L. D. H.; et al. Diversity of brazilian fungi. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

MAJEED, H.; ANTONIOU, J.; HATEGEKIMANA, J.; et al. Influence of carrier oil type, particle size on invitro lipid digestion and eugenol release in emulsion and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 415–422, 2016.

MALEŠEVIĆ, V. K.; VAŠTAG, Ž.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L.; SENKA, M.-P.; PERIČIN-STARČEVIĆ, I. Microencapsulation Technology and Essential Oil Pesticides for Food Plant Production. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. p.123–129, 2016.

MANDAL, S.; MANDAL, M. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 421–428, 2015.

MARCHESE, A.; BARBIERI, R.; COPPO, E.; et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, p. 668–689, 2017.

MARCHESE, ANNA; BARBIERI, R.; COPPO, E.; et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668–689, 2017.

MASUELLI, M. A. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 37–43, 2014.

MATOS, A. K. V. DE. Green Revolution, Biotechnology and Alternative Technologies. **Cadernos da FUCAMP**, v. 10, n. 12, p. 01–17, 2010.

MATSUHIRO, B.; TORRES, R.; UYARTE, O.; et al. Carboxymethylcellulose from bleached organosolv fibers of *Eucalyptus nitens*: synthesis and physicochemical characterization. **Cellulose**, v. 25, p. 2901–2914, 2018.

MAY-DE MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 821–827, 2011.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion

- stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. January, p. 1–8, 2018.
- MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Research International**, 2014.
- METODIEV, A. Electric Properties of Carboxymethyl Cellulose. **Cellulose - Fundamental Aspects**, 2013.
- MICHELIN, M.; MARQUES, A. M.; PASTRANA, L. M.; TEIXEIRA, J. A.; CERQUEIRA, M. A. Carboxymethyl cellulose-based films: Effect of organosolv lignin incorporation on physicochemical and antioxidant properties. **Journal of Food Engineering**, v. 285, n. January, 2020.
- MODARRES-GHEISARI, S. M. M.; GAVAGSAZ-GHOACHANI, R.; MALAKI, M.; SAFARPOUR, P.; ZANDI, M. Ultrasonic nano-emulsification – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, p. 88–105, 2019.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010a.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010b.
- MORAES, R. F. DE. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. **Ipea**, p. 76, 2019.
- MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Archives of Virology**, v. 146, n. 3, p. 415–441, 2001.
- MOTIN, M. A.; HAFIZ MIA, M. A.; NASIMUL ISLAM, A. K. M. Thermodynamic properties of Sodium Dodecyl Sulfate aqueous solutions with Methanol, Ethanol, n-Propanol and iso-Propanol at different temperatures. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 172–180, 2015.
- MUKHERJEE, K.; TRIBEDI, P.; MUKHOPADHYAY, B.; SIL, A. K. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, n. 2, p. 177–183, 2013.
- MUN, S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 296, p. 581–590, 2006.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 8174, 1-Decanol. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Decanol>. Acessado em 14 de julho de 2021.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3314, Eugenol. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol>. Acessado em 14 de julho de 2021.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6549, Linalool. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>. Acessado em 14 de julho de 2021.
- NATRAJAN, D.; SRINIVASAN, S.; SUNDAR, K.; RAVINDRAN, A. Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 560–568, 2015.

- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, p. 1–20, 2017.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010.
- VAN OSS, C. J.; GOOD, R. J.; CHAUDHURY, M. K. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. **Langmuir**, v. 4, n. 4, p. 884–891, 1988.
- OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; GIERSEWSKA-DRUZYŃSKA, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 590–598, 2009.
- ÖZEK, T.; TABANCA, N.; DEMIRCI, F.; WEDGE, D. E.; HÜSNÜ CAN BAŞER, K. Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 4, p. 180–192, 2010.
- PADALKAR, K. V.; GAIKAR, V. G.; ASWAL, V. K. Characterization of mixed micelles of sodium cumene sulfonate with sodium dodecyl sulfate and cetyl trimethylammonium bromide by SANS, FTIR spectroscopy and NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 144, p. 40–49, 2009.
- PANÁČEK, A.; KOLÁŘ, M.; VEČEROVÁ, R.; et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v. 30, p. 6333–6340, 2009.
- PARCHEN, G. P.; JACUMAZO, J.; KOOP, H. S.; et al. Modulation of Epidermal Growth Factor Release by Biopolymer-Coated Liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2294–2301, 2020.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 17–22, 2004.
- PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, n. July, p. 566–578, 2018.
- PEREIRA, R. F. P.; VALENTE, A. J. M.; BURROWS, H. D.; et al. Structural characterization of solid trivalent metal dodecyl sulfates: from aqueous solution to lamellar superstructures. **RSC Adv.**, v. 3, n. 5, p. 1420–1433, 2013.
- PEREIRA, W. V.; PADILHA, A. C. N.; KAISER, J. A. O.; et al. *Monilinia* spp. from imported stone fruits may represent a risk to Brazilian fruit production. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 120–131, 2019.
- PERRING, T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. Crop Protection. **Anais...** v. 20, p.725–737, 2001.
- PINTO, E.; ALVES, M. J. G.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of thapsia villosa essential oil against candida, cryptococcus, malassezia, aspergillus and dermatophyte species. **Molecules**, v. 22, n. 10, 2017.
- PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
- POOLMAN, J. T.; ANDERSON, A. S. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: leading bacterial pathogens of healthcare associated infections and bacteremia in older-age populations. **Expert Review**

of **Vaccines**, v. 17, n. 7, p. 607–618, 2018.

PRACHAYASITTIKUL, VEDA; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, VIRAPONG. Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being. **Food Research International**, v. 105, p. 305–323, 2018.

PRAKASH, A.; VADIVEL, V.; RUBINI, D.; NITHYANAND, P. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*. **Food Bioscience**, v. 28, n. p. 57–65, 2019.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RECILLAS, M.; SILVA, L. L.; PENICHE, C.; et al. Thermoresponsive Behavior of Chitosan- g - N - isopropylacrylamide Copolymer Solutions. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1633–1641, 2009.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RAGASSI, C. F.; et al. **Novos ângulos da história da agricultura no Brasil**. 2017.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science Polymers**, v. 31, p. 603–632, 2006.

RIVERA-BRISO, A. L.; SERRANO-AROCA, Á. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 1–28, 2018.

ROSSEZ, Y.; HOLMES, A.; LODBERG-PEDERSEN, H.; et al. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34349–34365, 2014.

SAAD, K. A.; MOHAMAD ROFF, M. N.; IDRIS, A. B. Toxic, repellent, and deterrent effects of citronella essential oil on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on chili plants. **Journal of Entomological Science**, v. 52, n. 2, p. 119–130, 2017.

SACCHETTI, P.; ROSSI, E.; BELLINI, L.; et al. Volatile organic compounds emitted by bottlebrush species affect the behaviour of the sweet potato whitefly. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 9, n. 4, p. 393–403, 2015.

SAIFULLAH, M.; SHISHIR, M. R. I.; FERDOWSI, R.; RAHMAN, M. T. R.; VUONG, Q. V. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 230–251, 2019.

SAIFULLAH, M.; SHISHIR, M. R. I.; FERDOWSI, R.; TANVER, R. M. R.; VAN, V. Q. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 230–251, 2019.

SAJOMSANG, W.; NUCHUCHUA, O.; GONIL, P.; et al. Water-soluble β -cyclodextrin grafted with chitosan and its inclusion complex as a mucoadhesive eugenol carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 623–631, 2012.

SANI, I.; ISMAIL, S. I.; ABDULLAH, S.; et al. A review of the biology and control of whitefly, *bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi. **Insects**, v. 11, n. 9, p. 1–18, 2020.

SATYAL, P.; SETZER, W. N. Chemical Compositions of Commercial Essential Oils From *Coriandrum*

- sativum Fruits and Aerial Parts. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 7, 2020.
- SEIBER, J. N.; COATS, J.; DUKE, S. O.; GROSS, A. D. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 48, p. 11613–11619, 2014.
- SENHORINI, G. A.; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W.; MARQUES, F. A. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1121–1126, 2012.
- SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L.; YUK, H. G. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 625–644, 2014.
- SHAO, YING; WU, C.; WU, T.; et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 144–152, 2018.
- SHAO, Y.; WU, C.; WU, T.; et al. Eugenol-chitosan nanoemulsions by ultrasound-mediated emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 144–152, 2018.
- SI TRUNG, T.; BAO, H. N. D. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitin and Chitosan Prepared from Pacific White Shrimp Waste. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2015, p. 1–6, 2015.
- DA SILVA, C. E. P.; DE OLIVEIRA, M. A. S.; SIMAS, F. F.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Physical chemical study of zein and arabinogalactans or glucuronomannans polyelectrolyte complexes and their film-forming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 100, p. 105394, 2020.
- SILVA, L. L.; BALCONI, L. S.; GRESSLER, L. T.; et al. S-(+)- and r-(-)-linalool: A comparison of the in vitro anti-aeromonas hydrophila activity and anesthetic properties in fish. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 1, p. 203–212, 2017.
- SOTELO-BOYÁS, M.; CORREA-PACHECO, Z.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; GÓMEZ Y GÓMEZ, Y. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 409–414, 2017.
- STORK, N. E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 31–45, 2018.
- SUADA, I. K.; SUDARMA, I. M.; KIM, B. S.; CHA, J. Y.; OHGA, S. Fungal contaminant threaten oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kummer) cultivation in bali. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 60, p. 309–313, 2015.
- SZCZEPANOWICZ, K.; BAZYLIŃSKA, U.; PIETKIEWICZ, J.; et al. Biocompatible long-sustained release oil-core polyelectrolyte nanocarriers: From controlling physical state and stability to biological impact. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 222, p. 678–691, 2015.
- TEBALDI, M. L.; MAIA, A. L. C.; POLETTO, F.; DE ANDRADE, F. V.; SOARES, D. C. F. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 115–126, 2019.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.

- Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.
- TOGASHI, N.; SHIRAISHI, A.; NISHIZAKA, M.; et al. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 12, n. 2, p. 139–148, 2007.
- TOGNI, P. H. B.; LAUMANN, R. A.; MEDEIROS, M. A.; SUJII, E. R. Odour masking of tomato volatiles by coriander volatiles in host plant selection of *Bemisia tabaci* biotype B. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 136, n. 2, p. 164–173, 2010.
- TOĞRUL, H.; ARSLAN, N. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 73–82, 2003.
- TRIYANA, K.; SEMBIRING, A.; RIANJANU, A.; et al. Chitosan-based quartz crystal microbalance for alcohol sensing. **Electronics (Switzerland)**, v. 7, n. 9, p. 1–11, 2018.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 2013a.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 40–53, 2013b.
- VOIGT, U.; JAEGER, W.; FINDENEGG, G. H.; KLITZING, R. V. Charge effects on the formation of multilayers containing strong polyelectrolytes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 22, p. 5273–5280, 2003.
- WALKE, S.; SRIVASTAVA, G.; NIKALJE, M.; et al. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 188–198, 2015.
- WANG, W.; BO, S.; LI, S.; QIN, W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 281–285, 1991.
- WANG, W.; HAO, X.; CHEN, S.; et al. pH-responsive Capsaicin@chitosan nanocapsules for antibiofouling in marine applications. **Polymer**, v. 158, p. 223–230, 2018.
- WANG, X.; SHEN, Y.; THAKUR, K.; et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 25, n. 17, 2020.
- WEI, J. N.; LIU, Z. H.; ZHAO, Y. P.; et al. Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, v. 286, n. January, p. 260–267, 2019.
- WEI, L.; GUHO, N. M.; COATS, E. R.; MCDONALD, A. G. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biosynthesized by mixed microbial consortia fed fermented dairy manure. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 11, 2014.
- WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 578–585, 2013.
- XIAO, Z.; XU, Z.; ZHU, G. Production and characterization of nanocapsules encapsulated linalool by ionic gelation method using chitosan as wall material. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 613–619, 2017.
- XU, Y.; WEI, J.; WEI, Y.; et al. Tea tree oil controls brown rot in peaches by damaging the cell membrane of *Monilinia fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 175, 111474, 2021.

- YANG, B.; RAO, R. Emerging Pathogens of the Candida Species. **Candida Albicans**, p. 3–18, 2019.
- YUE, Y.; ZHENG, L.; WANG, Y.; et al. A novel polyamidine-grafted carboxymethylcellulose : flocculation performance test. **Polymers**, v. 19, p. 225–234, 2019.
- ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. L.; GONZÁLEZ-REZA, R.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; et al. Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.
- ZERINGÓTA, V.; SENRA, T. O. S.; CALMON, F.; et al. Repellent activity of eugenol on larvae of Rhipicephalus microplus and Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2675–2679, 2013.
- ZHANG, H.; ZHAO, Y. Preparation, characterization and evaluation of tea polyphenol-Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 260–273, 2015.
- ZHANG, SHOUWEI; LIU, W.; LIANG, J.; et al. Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1135–1143, 2013.
- ZHANG, S.; LIU, W.; LIANG, J.; et al. Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films. **Cellulose**, v. 20, p. 1135–1143, 2013.

APÊNDICE 1

FIGURA A1 - CROMATOGRAMAS (CG-EM) DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DAS SEMENTES DO *C. sativum* POR HIDRODESTILAÇÃO (a) E PADRÃO DE ALCANOS (b)

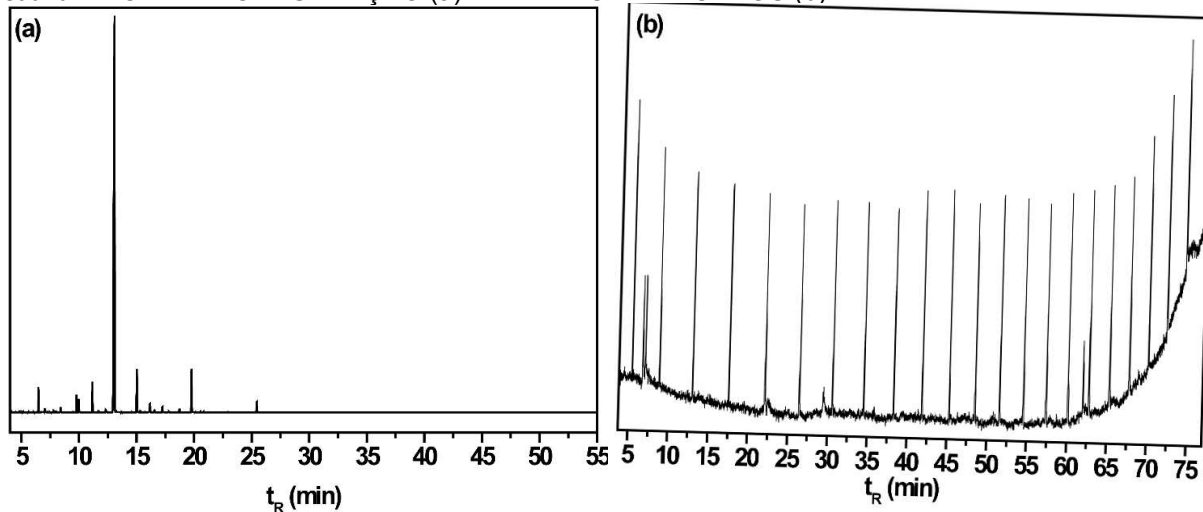


FIGURA A2 - ESPECTROS DE MASSAS DO LINALOL (a) COMPOSTO MAJORITÁRIO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DO *C. sativum* (b) COMPARAÇÃO COM A BIBLIOTECA NIST (c) ESQUEMA DE POSSÍVEIS FRAGMENTAÇÃO PARA O LINALOL

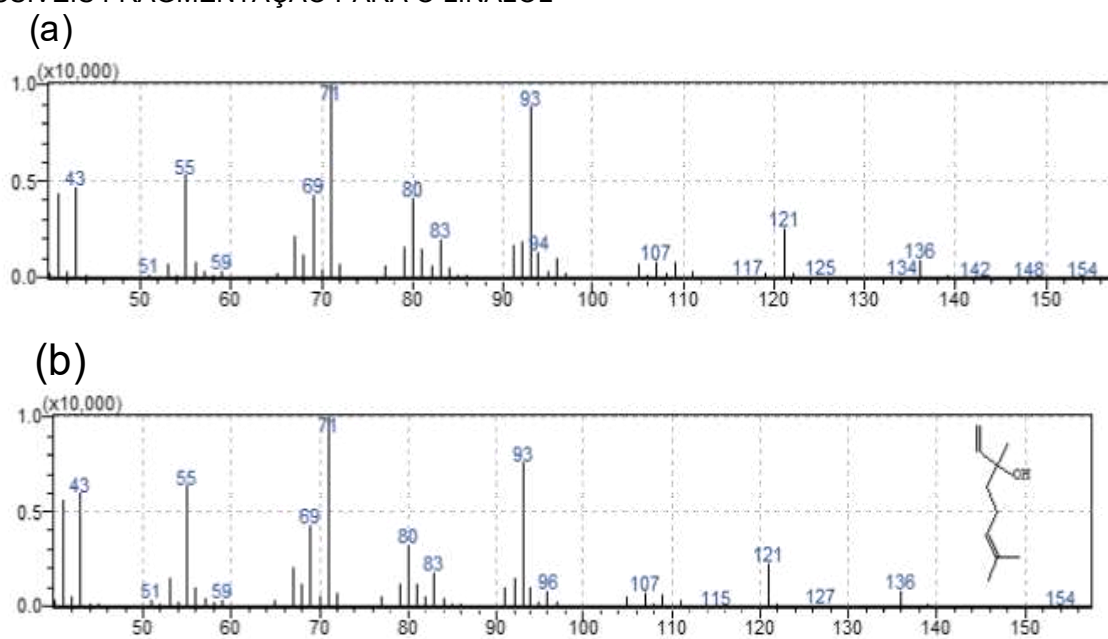


FIGURA A3 - CROMATOGRAMAS (CG-EM) DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS DAS FOLHAS DA PLANTA *C. sativum* (a) CONDIÇÃO A (CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO, MACERAÇÃO E ADSORÇÃO VIA SPME), (b) CONDIÇÃO B (MACERAÇÃO À TEMPERATURA AMBIENTE E ADSORÇÃO POR SPME), (c) PADRÃO DE ALCANOS OBTIDOS POR SPME

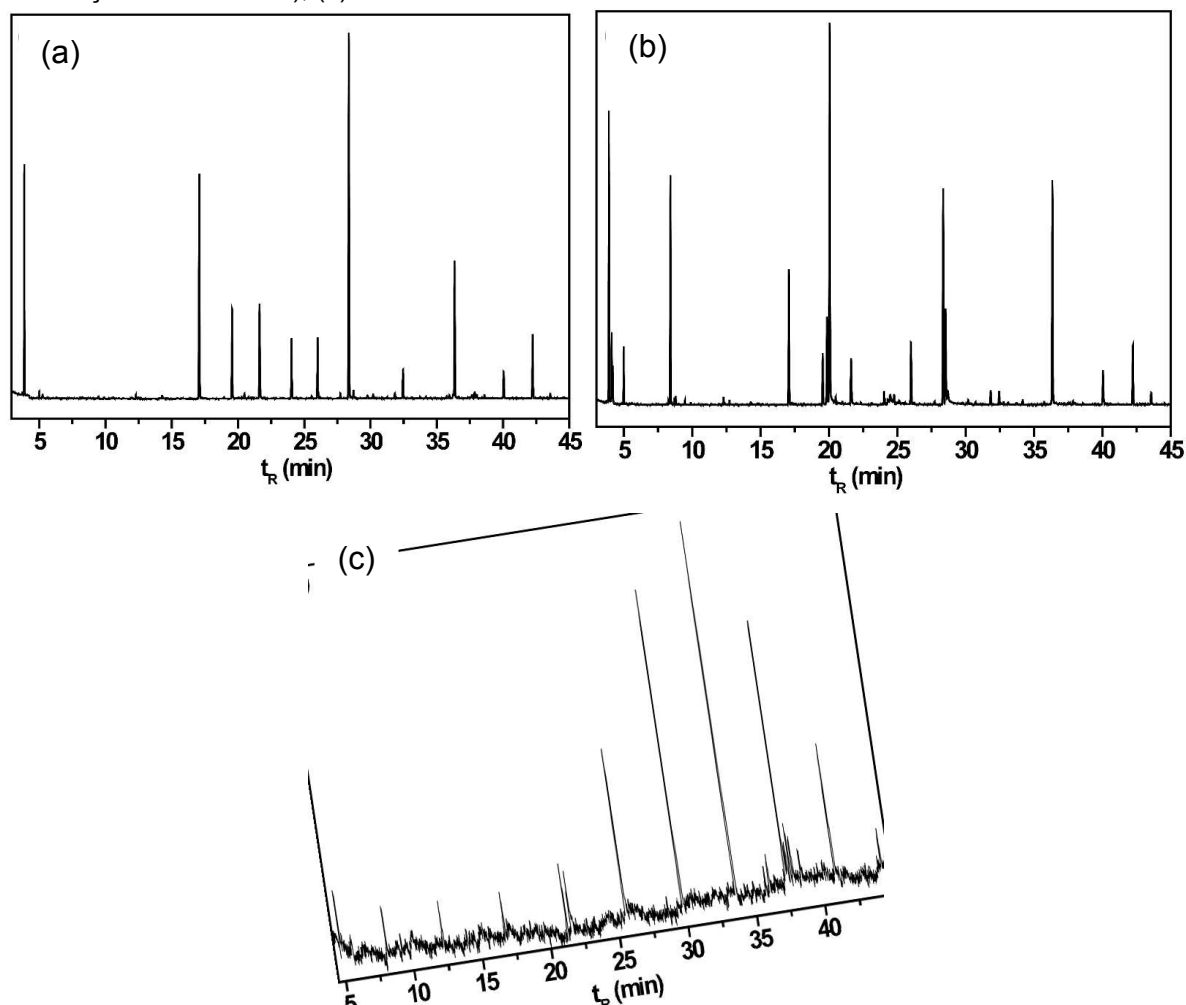
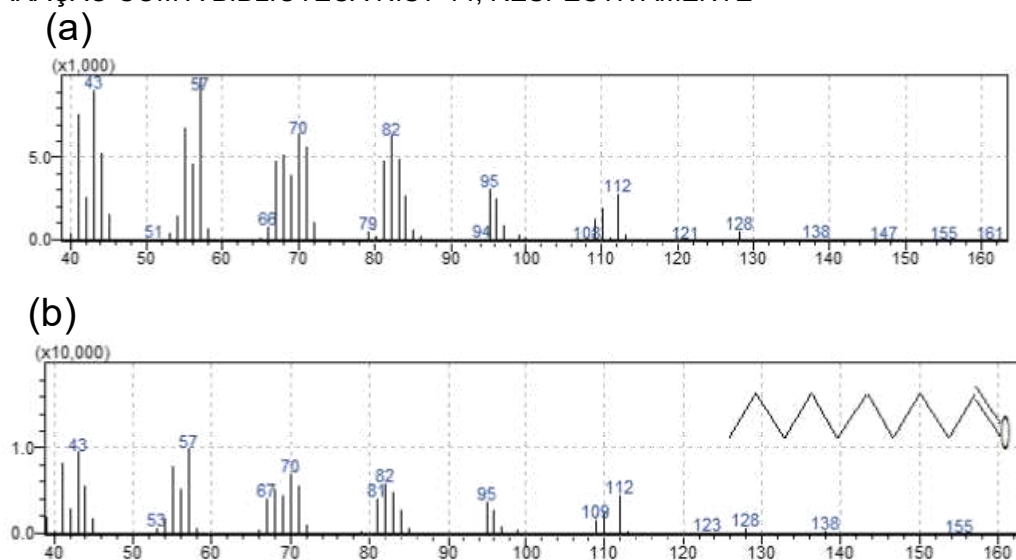


FIGURA A4. ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DO *C. sativum* POR MEIO DA CONDIÇÃO A (a) DECANAL, (c) (2E)-DODECENAL, (b) e (d) COMPARAÇÃO COM A BIBLIOTECA NIST-14, RESPECTIVAMENTE



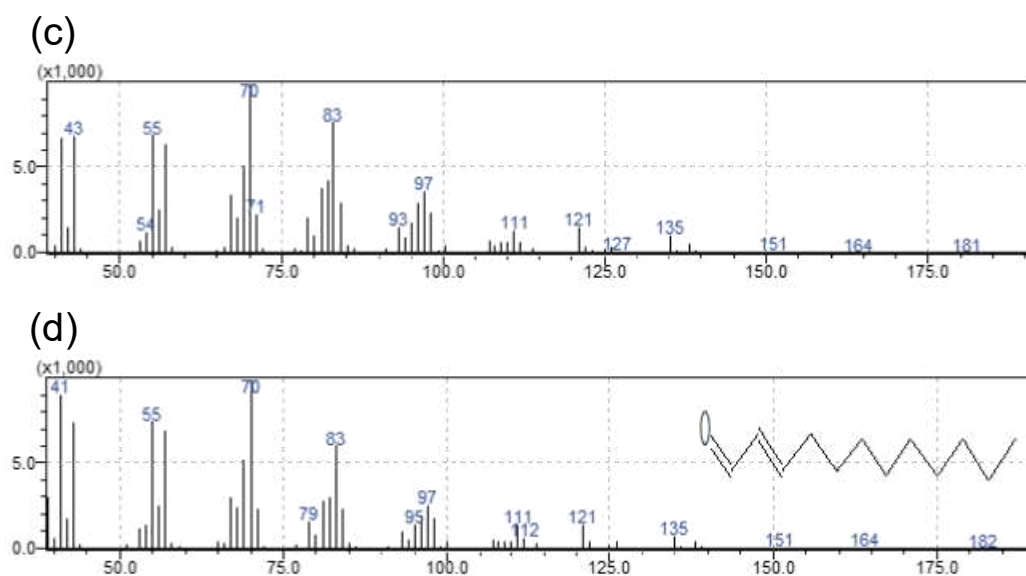


FIGURA A5. ESPECTROS DE MASSAS DO COMPOSTO MAJORITÁRIO EXTRAÍDO DAS FOLHAS DO *C. sativum* POR MEIO DA CONDIÇÃO B (a) 1-DECANOL, (b) COMPARAÇÃO COM A BIBLIOTECA NIST-14

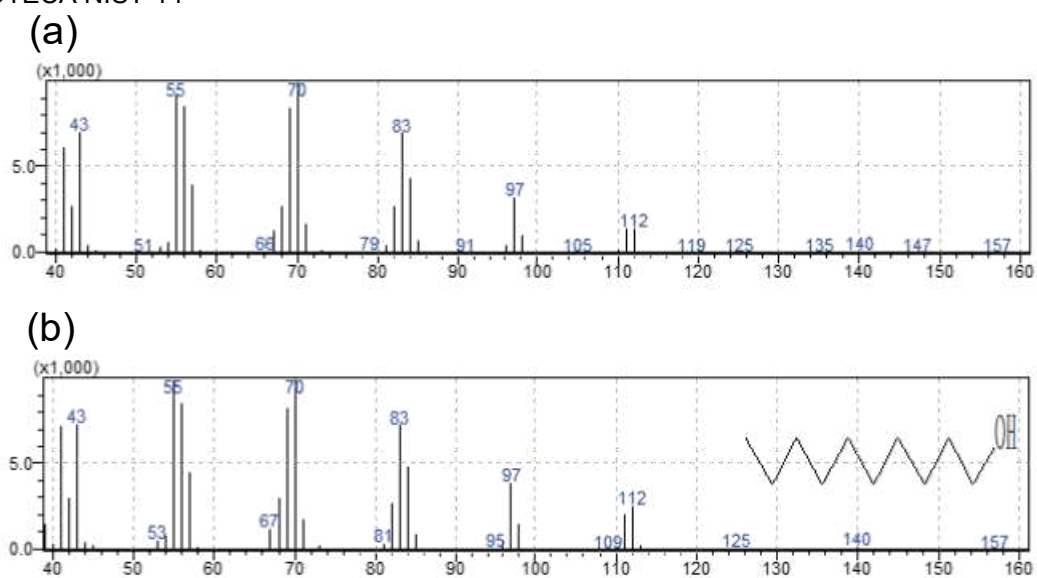


FIGURA A6 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFREVERMELHO PARA O LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE QUITOSANA E CARBOXIMETILCELULOSE NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS E NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DOS ATIVOS

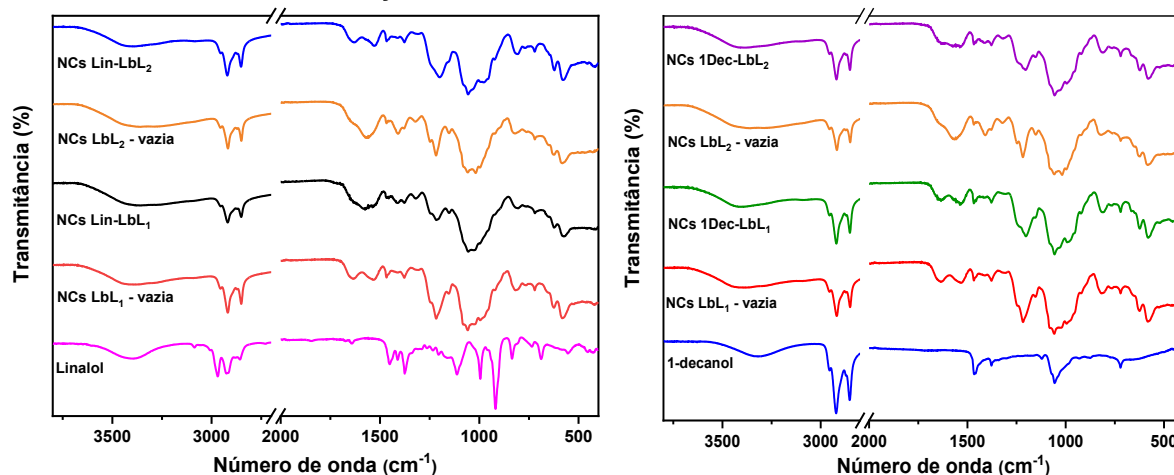


FIGURA A7 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFREVERMELHO PARA O EUGENOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV NA AUSÊNCIA DO ATIVO E NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DO ATIVO

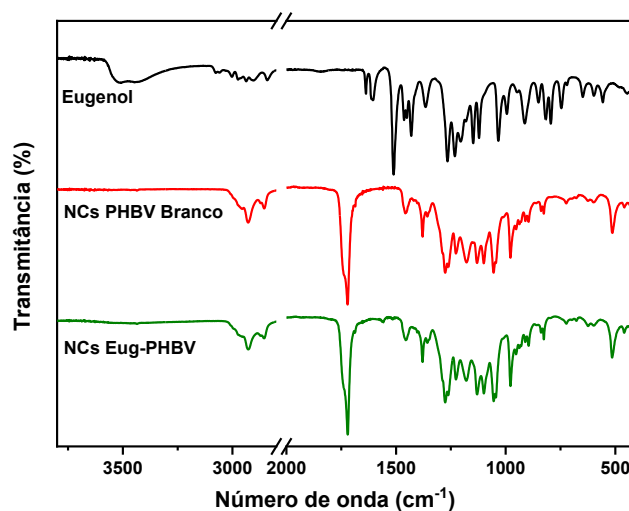


FIGURA A8 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFREVERMELHO PARA O LINALOL OU 1-DECANOL, NANOCÁPSULAS DE PHBV NA AUSÊNCIA DOS ATIVOS E NANOCÁPSULAS NA PRESENÇA DOS ATIVOS

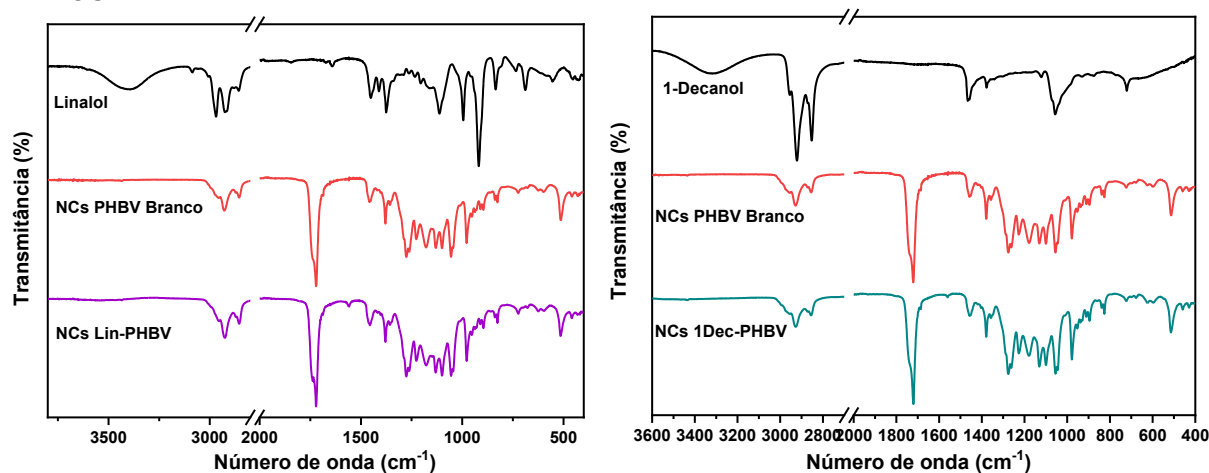
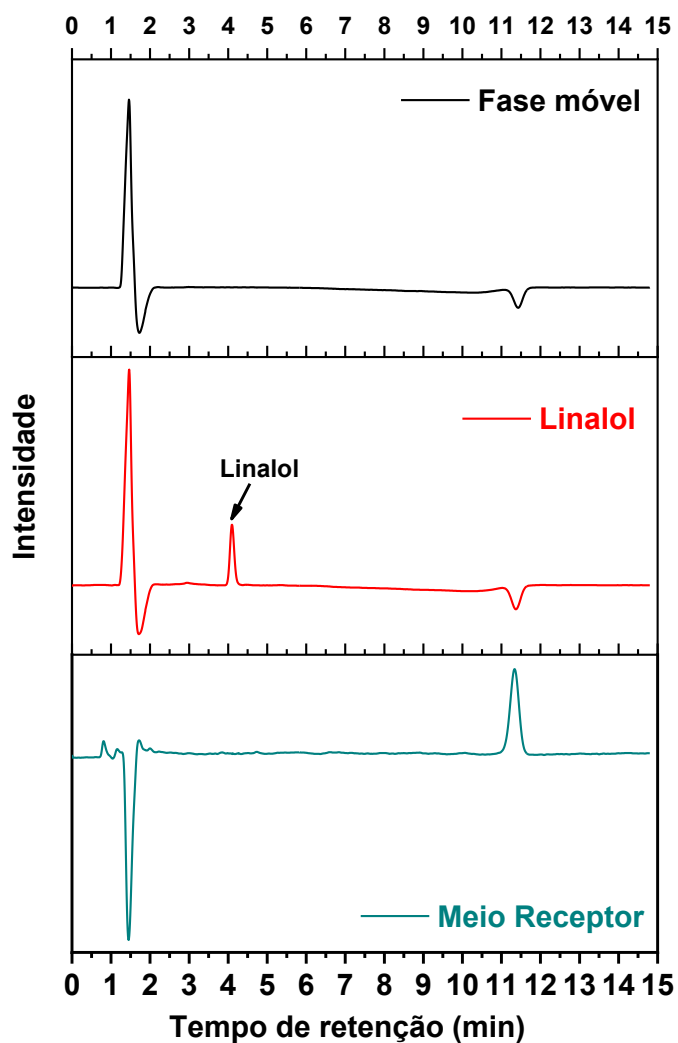
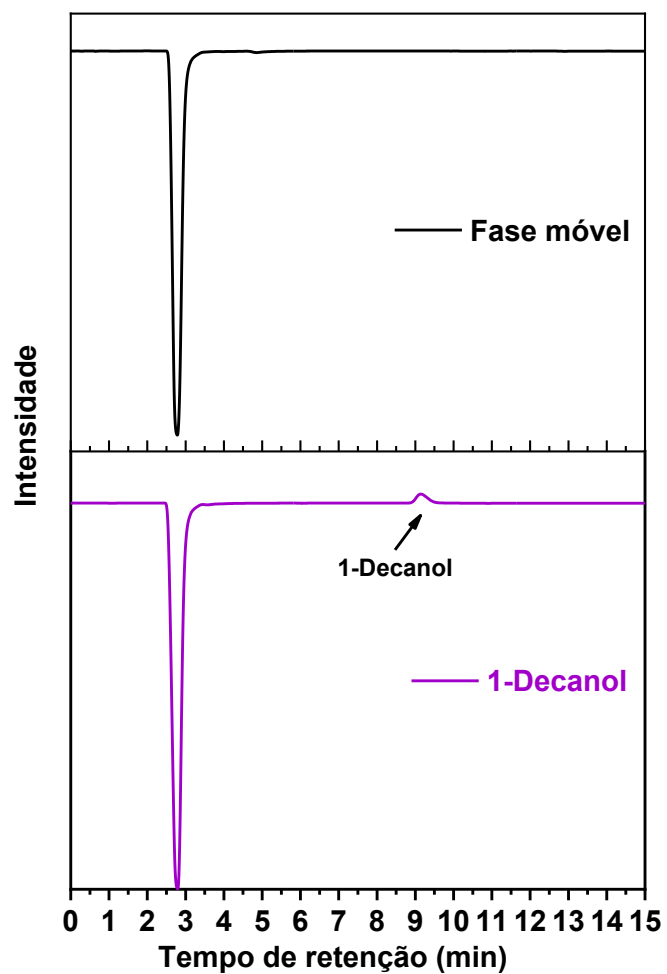


FIGURA A9 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL, DO LINALOL E DO MEIO RECEPTOR OBTIDOS POR CLAE – UV-Vis ($\lambda = 210$ nm) (COLUNA SYMMETRY C-18 A 30 °C, FASE MÓVEL 60% ACETONITRILA E 40% H₂O, TEMPO DE ELUIÇÃO 15 MIN)



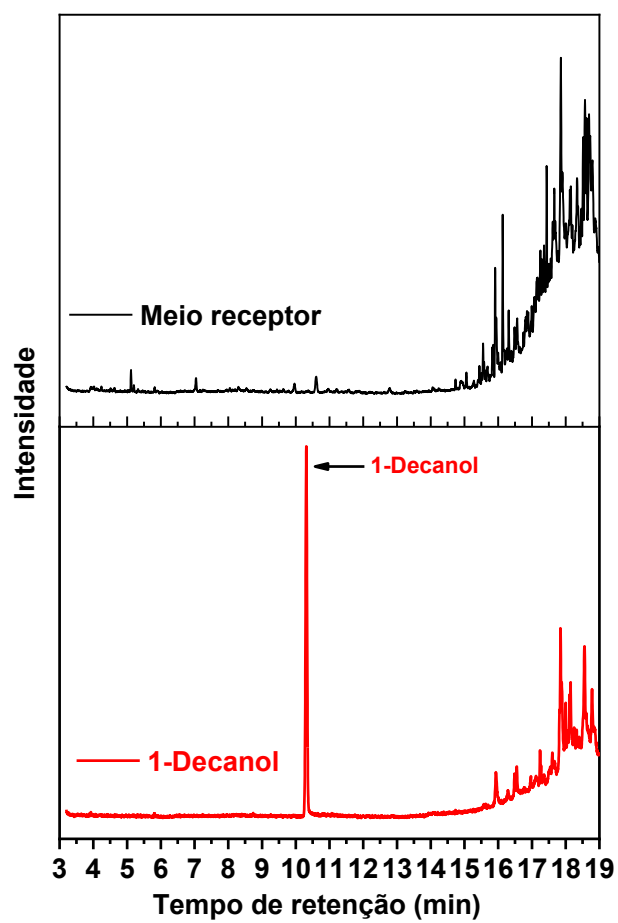
O tempo de retenção para o linalol foi em 4,1 min.

FIGURA A10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL E DO 1-DECANOL OBTIDOS POR CLAE – IR (COLUNA SYMMETRY C-18 A 30 °C, FASE MÓVEL 80% METANOL E 20% H₂O, TEMPO DE ELUIÇÃO 15 MIN)



O tempo de retenção para o 1-decanol foi em 9,1 min.

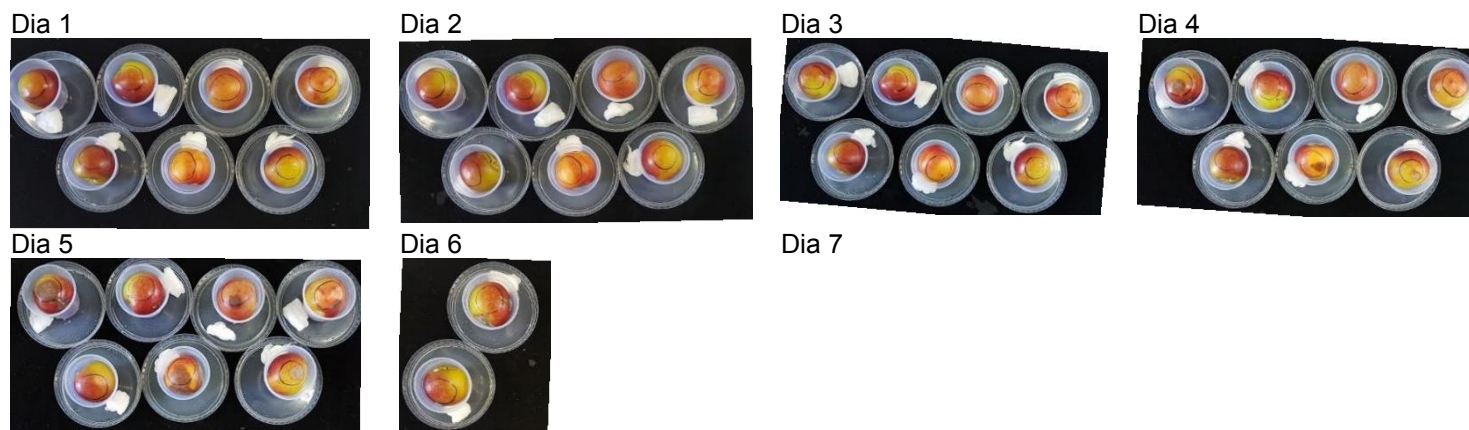
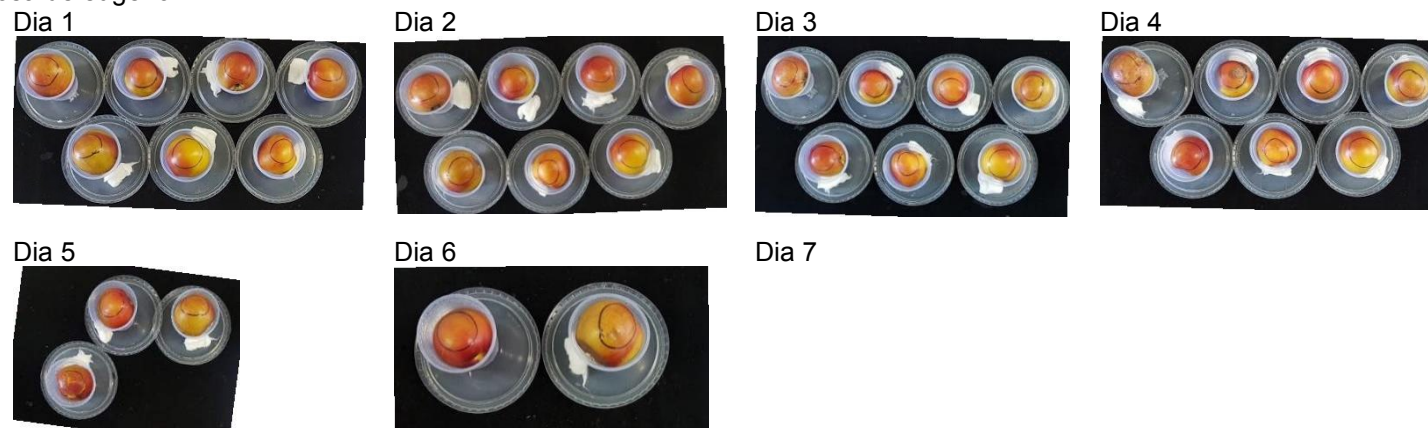
FIGURA A11 - PERFIL DE ELUIÇÃO DO MEIO RECEPTOR E DO 1-DECANOL OBTIDOS POR CG-EM (TEMPO DE ELUIÇÃO 19 MIN)



O tempo de retenção para o 1-decanol foi em 10,3 min.

FIGURA A12 - TESTE DE INIBIÇÃO DO FUNGO *Monilinia fructicola* PELO PERÍODO DE 7 DIAS USANDO (a) SOLUÇÃO AQUOSA DE EUGENOL, (b) FUNGICIDA IPRODIONA, (c) CONTROLE (d) NANOCÁPSULAS NA AUSÊNCIA DE EUGENOL (e) NANOCÁPSULAS Eug-LbL₁ E (f) NANOCÁPSULAS Eug-LbL₂

(a) Solução aquosa de eugenol



(b) Fungicida Iprodiona

Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



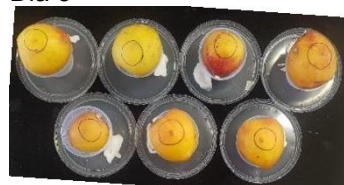
Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



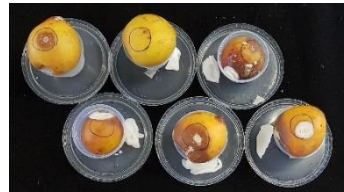
Dia 5



Dia 6

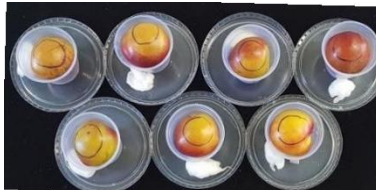


Dia 7



(c) Controle

Dia 1



Dia 2



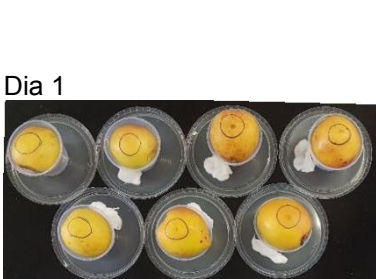
Dia 3



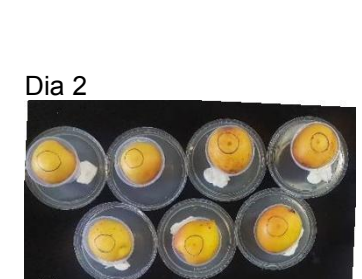
Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



Dia 1



Dia 2



Dia 3



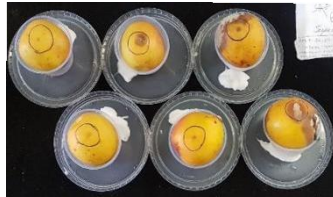
Dia 4



Dia 5



Dia 6

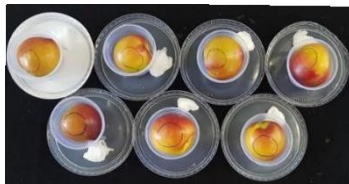


Dia 7

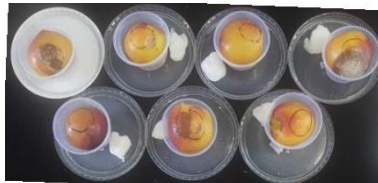


(d) Nanocápsulas na ausência de eugenol

Dia 1



Dia 5



Dia 2



Dia 6



Dia 3



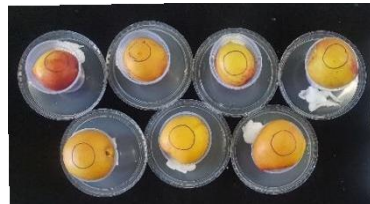
Dia 7



Dia 4



Dia 1



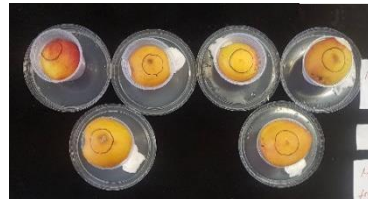
Dia 5



Dia 2



Dia 6



Dia 3



Dia 7



Dia 4



(e) Nanocápsulas Eug-LbL₁

Dia 1



Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



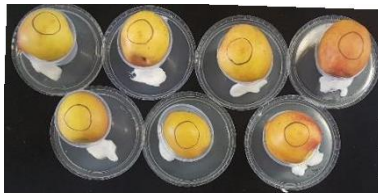
Dia 6



Dia 7



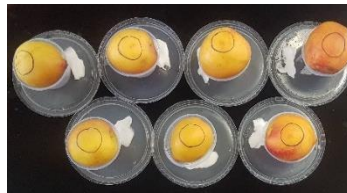
Dia 1



Dia 2



Dia 3



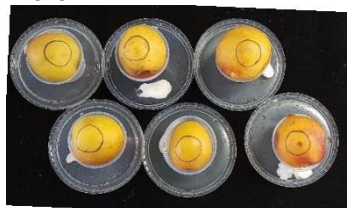
Ddia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



(f) Nanocápsulas Eug-LbL₂

Dia 1



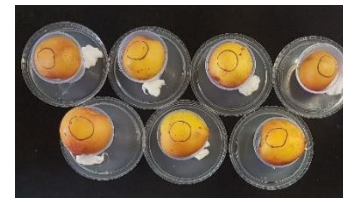
Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7



Dia 1



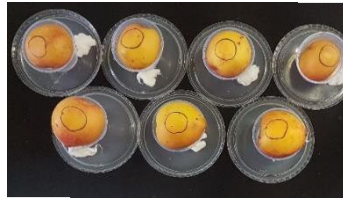
Dia 2



Dia 3



Dia 4



Dia 5



Dia 6



Dia 7

ANEXO 1

Informações acadêmicas:

Disciplina	Conceito
QUIM-7039 – Seminários D2	A
CQU-7039 – Seminários D1	A
CQ-736 – Tópicos Especiais em Química II	B
CQU-7049 – Polymers in Solution: Conformation, Thermodynamics and Methods of Investigation	B
CQU-7036 – Redação de Artigos Científicos e Ética em Publicação.	A
CQU-7024 – Nanoquímica e Nanomateriais	B
QUIM-7045 – Tópicos Especiais em Química I - Acidez e Basicidade de Compostos Orgânicos	A
QUIM-7008 – Estrutura e Reatividade de Compostos Orgânicos I.	A
QUIM7008 – Estrutura e Reatividade de Compostos Orgânicos II	A
QUIM7048 – Artes Gráficas Aplicadas a Ciência	B
QUIM7024 – Prática de Docência em Química.	A
QUIM-7048 - Tópicos Especiais em Química IV - Fitoquímica em um dia (Curso Teórico e Prático Sobre Métodos de Purificação)	A
QUIM-7045 – Tópicos Especiais em Química I - Química Verde	A
QUIM-7018 – Métodos Cromatográficos	C

ANEXO 2

Publicações:

Jacumazo, Joslaine; De Carvalho, Mariana M.; Parchen, Gabriela Pereira; Campos, Izabela M.F.; Ballesteros Garcia, Meira J.; Brugnari, Tatiana; Maciel, Giselle Maria; Marques, Francisco A.; De Freitas, Rilton A. **Development, Characterization and Antimicrobial Activity of Sodium Dodecyl Sulfate-Polysaccharides Capsules Containing Eugenol**. Carbohydrate Polymers, v. 230, p. 115562, 2019.

Parchen, Gabriela Pereira; Jacumazo, Joslaine; Koop, Heidegrid Siebert; Biscaia, Stelée Marcela Petris; Trindade, Edvaldo S.; Silveira, Joana Léa Meira; De Freitas, Rilton Alves. **Modulation of Epidermal Growth Factor Release by Biopolymer-Coated Liposomes**. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 109, p. 2294-2301, 2020.

De Seixas-Junior, Carlos H.; De Carvalho, Mariana M.; Jacumazo, Joslaine; Piazza, Rodolfo D.; Parchen, Gabriela P.; De Freitas, Rilton A. **Interaction of guar gum galactomannans with the anionic surfactant sodium lauryl ether sulphate**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 165, p. 713-721, 2020.

Participação em eventos:

- IV Escola de Verão em Coloides e Superfícies, dias 23 a 27/01/2017, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), São Paulo/SP.

- Franco-Brazilian Meeting on Farmaceutical Sciences, de 13 a 14/02/2017, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.
- Celebração dos 25 anos do Programa de Pós-Graduação em Química, de 21 a 22/09/2017, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.
- X Encontro Brasileiro de Ecologia Química (XEBEQ) - X Brazilian Meeting of Chemical Ecology, Memorial Meeting for Prof. José Tércio B. Ferreira (1952-1997), dias 04 a 07/12/2017, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP.
- XXXI Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – SEPE, de 13 a 18/05/2020, na Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.
- IV AFM Workshop, dias 4 e 5/07/2019, no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) – Campinas/SP.
- 5a Escola de Inverno em Ecologia Química, de 8 a 12/07/2019, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.
- XXIV Semana Acadêmica de Química, de 07 a 11/10/2019, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.
- II Simpósio de Ciências Farmacêuticas, de 02 a 06/12/2019, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR.
- I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB), de 01 a 04/06/2020, Evento online da Embrapa, Brasília/Brasil.
- I Semana Científica Virtual de Bioquímica, de 14 a 18/09/2020, na Universidade Federal do Paraná (UFPR) evento online, Curitiba/PR.
- III Simpósio de Graduação e Pós-Graduação do DAQBI, de 28 a 30/09/2020, evento online da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba/PR.
- Encontro de Polímeros Naturais (Meeting on Natural Polymer) II EPNAT, de 21 a 23/11/2020, evento online.